

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBLE I
SCIENCES ET GEOGRAPHIE

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : BIOLOGIE STRUCTURALE

Présentée et soutenue publiquement

par

Florence LUTTRINGER

Le 10 novembre 2006

**La ribonucléotide réductase anaérobie d'*Escherichia coli*,
une protéine à zinc**

Importance du site métallique pour la structure et l'activation de l'enzyme

COMPOSITION DU JURY

Président	:	Dr. Florent GUILLAIN
Rapporteurs	:	Dr. Catherine BERTHOMIEU Dr. Jean-Luc BOUCHER
Directeur	:	Dr. Etienne MULLIEZ
Codirecteur	:	Pr. Marc FONTECAVE

Laboratoire de Chimie et Biochimie des Centres Rédox Biologiques
CEA-Grenoble, DRDC/CBCRB-CNRS-Université Joseph Fourier

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBLE I
SCIENCES ET GEOGRAPHIE

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : BIOLOGIE STRUCTURALE

Présentée et soutenue publiquement

par

Florence LUTTRINGER

Le 10 novembre 2006

**La ribonucléotide réductase anaérobie d'*Escherichia coli*,
une protéine à zinc**

Importance du site métallique pour la structure et l'activation de l'enzyme

COMPOSITION DU JURY

Président	:	Dr. Florent GUILLAIN
Rapporteurs	:	Dr. Catherine BERTHOMIEU Dr. Jean-Luc BOUCHER
Directeur	:	Dr. Etienne MULLIEZ
Codirecteur	:	Pr. Marc FONTECAVE

Laboratoire de Chimie et Biochimie des Centres Rédox Biologiques
CEA-Grenoble, DRDC/CBCRB-CNRS-Université Joseph Fourier

Sommaire

- INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE - 1

A - Les protéines radicalaires.....	1
A.I - Identification et propriétés des radicaux protéiques	1
A.II - Biosynthèse des radicaux protéiques	3
A.II.1 - Fer et oxygène moléculaire	4
A.II.2 - Cuivre et oxygène moléculaire	6
A.II.3 - L'adénosylcobalamine (coenzyme B12)	9
A.II.4 – Centre [4Fe-4S] et S-adénosylméthionine	11
 B - Les protéines à radical glycinyle.....	 16
B.I - Caractéristiques générales.....	16
B.II - La ribonucléotide réductase anaérobie.....	19
B.II.1 - Les ribonucléotides réductases : présentation générale.....	19
B.II.2 - La ribonucléotide réductase anaérobie d' <i>E. coli</i>	21
<i>B.II.2.a - Le système RNR</i>	<i>21</i>
<i>❖ Identification des composants du système</i>	
<i>❖ Organisation génétique</i>	
<i>B.II.2.b - L'activase ou protéine β.....</i>	<i>22</i>
<i>❖ Le centre fer-soufre de l'activase</i>	
<i>❖ Centre fer-soufre et activation de la protéine α</i>	
<i>B.II.2.c - La réductase ou protéine α.....</i>	<i>26</i>

◆ *Propriétés générales*

◆ *Le radical glycinyle*

◆ *Structure de la protéine α*

◆ *Mécanisme enzymatique*

B.II.2.d – Le complexe $\alpha_2\beta_2$ 34

B.II.2.e – Le test d'activité RNR 35

DEFINITION DU PROJET..... 36

◆ Le site métallique de la protéine α

◆ Activation de la protéine α

- MATRIELS ET METHODES - 38

A - Matériel biologique 38

A.I - Souches bactériennes..... 38

A.I.1 - *E. coli* DH5 α 38

A.I.2 - *E. coli* JM109(DE3) 38

A.I.3 - *E. coli* BL21(DE3) 38

A.II – Plasmides..... 38

A.II.1 – pRSS 39

A.II.2 - pRSSC644A, pRSSC647A, pRSSC662A et pRSSC665A 39

A.II.3 - pRSSG681A 39

A.II.4 - pT7 α	39
A.II.5 - pT7 α C550A.....	39
A.II.6 - pT7 α C680A.....	40
A.II.7 - pN9	40
A.III - Milieux de culture.....	40
A.IV - Surexpression des protéines	40
A.IV.1 - Surexpression des réductases	40
A.IV.1.a - Surexpression en anaérobiose.....	41
A.IV.1.b - Surexpression en aérobiose.....	41
♦ En milieu LB	
♦ En milieu M9	
<u>αGlyD et αC680AglyD</u>	
<u>αCo et « apoα »</u>	
A.IV.2 - Surexpression de l'activase.....	43
B - Méthodes de biologie moléculaire.....	43
B.I - Transformation des souches d'<i>Escherichia coli</i>.....	43
B.I.1 - Préparation de cellules compétentes	43
B.I.2 – Transformation	44
B.II - Préparation d'ADN plasmidique par lyse alcaline	44
B.III - Précipitation à l'éthanol.....	45
B.IV – Digestion.....	45

B.V - Electrophorèse sur gel d'agarose.....	45
B.VI - Mutagenèse dirigée	46
C - Méthodes biochimiques	47
C.I - Préparation d'extraits solubles	47
C.I.1 - Protocole standard.....	47
C.I.2 – Variantes.....	48
C.II - Purification des protéines.....	48
C.II.1 - Purification des réductases	48
<i>C.II.1.a - Protocoles généraux.....</i>	<i>48</i>
<i>❖ Chromatographie sur support hydrophobe Butyl Sepharose</i>	
<i>❖ Chromatographie d'affinité d'ATP Sepharose</i>	
<i>C.II.1.b - Protocoles spécifiques.....</i>	<i>49</i>
C.II.2 - Purification de l'activase	50
<i>C.II.2.a - Chromatographie d'échange d'anions Q XL.....</i>	<i>50</i>
<i>C.II.2.b - Chromatographie de filtration sur gel SDX 75.....</i>	<i>50</i>
C.III - Reconstitution de l'activase.....	51
C.IV - Réduction de l'activase	51
C.IV.1 - Réduction chimique	52
C.IV.2 - Réduction photochimique	52
C.V - Mesure d'activités enzymatiques.....	52

C.V.1 - Activité ribonucléotide réductase	52
C.V.2 - Activité SAM réductase	53
<i>C.V.2.a - Réductolyse de la SAM</i>	53
❖ <i>Activation avec β pré-réduite</i>	
❖ <i>Activation catalytique</i>	
<i>C.V.2.b - Analyse de méthionine</i>	54
<i>C.V.2.c - Analyse de 5'-désoxyadénosine</i>	54
C.VI - Caractérisations biochimiques	55
C.VI.1 - Dosage de protéines	55
C.VI.2 - Dosage de fer.....	55
<i>C.VI.2.a - Dosage colorimétrique</i>	55
❖ <i>Gamme étalon</i>	
❖ <i>Protocole</i>	
<i>C.VI.2.b - Dosage par spectroscopie d'absorption atomique</i>	56
C.VI.3 - Dosage de zinc	57
<i>C.VI.3.a - Dosage par spectroscopie d'absorption atomique</i>	57
<i>C.VI.3.b - Dosage par colorimétrie</i>	57
❖ <i>Gamme étalon</i>	
❖ <i>Echantillon protéique</i>	
❖ <i>Protocole</i>	
C.VI.4 – Détermination de l'état rédox de la réductase	58
C.VI.5 - Détermination de la constante d'association du zinc à la protéine α	58

C.VI.6 - Electrophorèse sur gel SDS-PAGE	59
<i>C.VI.6.a - Contrôle de la surexpression</i>	<i>59</i>
<i>C.VI.6.b - Contrôle de la pureté des protéines</i>	<i>60</i>
C.VI.7 - Spectrométrie de masse	60
<i>C.VI.7.a - Spectrométrie de masse électrospray.....</i>	<i>60</i>
<i>C.VI.7.b - Spectrométrie de masse MALDI-TOF.....</i>	<i>61</i>
D - Méthodes biophysiques.....	62
D.I - Spectroscopie d'absorption UV-visible	62
D.I.1 – Principe.....	62
D.I.2 - Application aux métalloprotéines	63
D.I.3 – Appareillage	63
D.II - Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE)	63
D.II.1 – Principes.....	64
D.II.2 - Structures hyperfines	65
D.II.3 - Largeur de raies	66
<i>D.II.3.a - “ g-strain ”</i>	<i>66</i>
<i>D.II.3.b - Effet de la température.....</i>	<i>66</i>
D.II.4 – Appareillage.....	67
E - Réactifs et synthèses chimiques.....	67

E.I – Réactifs.....	67
E.II - Synthèse de la résine d'affinité dATP Sepharose	67
E.II.1 - Synthèse du dATP.....	68
<i>Conversion du sel de sodium du dATP (1) en sel de triéthylammonium (2)</i>	
<i>Conversion du 2'-désoxyadénosine 5'-triphosphate (2) en désoxyadénosine-5'-trimetaphosphate (3)</i>	
<i>Synthèse et purification du 2'-désoxyadénosine-5'-(γ4-nitrophényl)-triphosphate (4)</i>	
<i>Synthèse du 2'-désoxyadénosine-5'-(γ4-aminophényl)-triphosphate (5)</i>	
E.II.2 - Synthèse de la dATP Sepharose	70
 - RESULTATS -	 72
 - CHAPITRE I -	 72
 A - Identification du métal lié à la protéine α	 72
A.I - Dosage de fer et de zinc par spectroscopie d'absorption atomique.....	72
A.II - Dosage de zinc par colorimétrie	74
A.II.1 – Principe	74
A.II.2 – Applications	75
A.II.2.a - Gamme étalon.....	75

<i>A.II.2.b - Analyse d'échantillons de protéine</i>	76
A.II.3 - Avantages de la méthode	78
B - Préparation de la protéine α	79
B.I - A partir de cultures en milieu LB	79
B.I.1 - Surexpression et extraction	79
<i>B.I.1.a - En anaérobiose</i>	79
<i>B.I.1.b - En aérobiose</i>	79
B.I.2 – Extraction	80
B.I.3 – Purification	80
<i>B.I.3.a - Purification par chromatographie sur support hydrophobe</i> <i>Butyl Sepharose</i>	80
❖ Ancien protocole	
❖ Protocole modifié	
<i>B.I.3.b - Purification par chromatographie d'affinité dATP Sepharose</i>	83
B.I.4 - Détermination du contenu en zinc des protéines	85
B.II - A partir de cultures en milieu M9	85
B.II.1 - En conditions classiques	85
<i>B.II.1.a - Surexpression et extraction</i>	85
❖ Surexpression	
❖ Extraction	
<i>B.II.1.b – Purification</i>	86
B.II.2 - En conditions contrôlées	86

<i>B.II.2.a - Surexpression et extraction</i>	86
❖ <i>Surexpression</i>	
❖ <i>Extraction</i>	
<i>B.II.2.b – Purification</i>	87
B.II.3 - Détermination du contenu en zinc des protéines	88
B.III – Bilan	88
C - Caractérisation du site Zn(Cys)₄ de la protéine α	89
C.I - Démétallation de la protéine α	89
C.I.1 - Etude préliminaire	89
<i>C.I.1.a - Utilisation de chélateurs de métaux</i>	89
❖ <i>Effet de l'EDTA</i>	
❖ <i>Effet du TPEN</i>	
<i>C.I.1.b - Utilisation d'un réactif organomercurique</i>	92
C.I.2 - Essais de préparation de l'apoprotéine	93
C.II - Remétallation de la protéine α	95
C.II.1 - A partir d'une protéine α modifiée par le PMB	95
C.II.2 - A partir d'une protéine α traitée au TPEN	97
C.II.3 - A partir de préparations de protéine α pauvres en zinc	97
C.III - Incorporation de cobalt dans la protéine α	98
C.III.1 - Essais de substitution du zinc par du cobalt	98
C.III.2 - Préparation de la protéine α Co	98

<i>C.III.2.a – Surexpression et purification de la protéine αCo</i>	98
<i>C.III.2.b - Caractéristiques spectrales de la protéine αCo</i>	99
<i>C.III.2.c - Effet du zinc sur la protéine αCo</i>	100
D - Etude du rôle du site $\text{Zn}(\text{Cys})_4$ de la protéine α	101
D.I - Zinc et activité ribonucléotide réductase : première étude	101
D.I.1 - Utilisation de différentes préparations de protéine α	101
D.I.2 - Utilisation d'une préparation de protéine α traitée au TPEN	102
D.I.3 – Utilisation d'une préparation de protéine α pauvre en zinc	103
D.II – Zinc et intégrité structurale des protéines	104
D.II.1 - Existence d'une forme tronquée de la protéine α	104
<i>D.II.1.a - Mise en évidence</i>	104
<i>D.II.1.b – Généralisation</i>	106
D.II.2 - Identification du site de coupure	108
D.I.3 - Influence du zinc sur la structure de la protéine α	111
D.III - Site métallique et activité enzymatique : réexamen	112
D.III.1 - Caractérisation des nouvelles préparations de protéine α	112
D.III.2 - Etude des mutants αC644A et αC662A	113
<i>D.III.2.a - Préparation des protéines</i>	113
<i>D.III.2.b – Activités CTP réductase</i>	115

D.IV - Zinc et interaction α-β	116
D.IV.1 - Etude par chromatographie d'affinité d'ATP Sepharose	116
D.IV.2 - Etude par chromatographie de filtration sur gel	117
E – Discussion	119
E.I – Préambule bibliographique	119
E.II - Zinc et intégrité structurale de la protéine α	124
E.III - Zinc et activité enzymatique de la protéine α.....	127
 - CHAPITRE II -	 131
A - Le pont disulfure de la protéine α	131
A.I - Essai de localisation du pont disulfure par mutagenèse dirigée ...	131
A.I.1 - Préparation des mutants α C550A et α C680A.....	133
A.I.2 - Activité CTP réductase des mutants	135
A.I.3 – Etat rédox des mutants	136
A.II – Zinc et état rédox de la protéine α.....	137
A.III – Activité CTP réductase et DTT	141
B - Activation de la protéine α	142
B.I - Mécanisme de formation du radical glycinyne	142
B.I.1 - Aspect thermodynamique	142

<i>B.I.1.a - Préparation de la protéine αG681A</i>	143
<i>B.I.1.b - Activité SAM réductase</i>	143
B.I.2 - Transfert de radical de Ado [•] à la glycine 681	144
<i>B.I.2.a - Première étude</i>	146
❖ <i>Préparation de la protéine αGlyD</i>	
❖ <i>Activation de la protéine αGlyD</i>	
<i>Expérience en conditions stœchiométriques</i>	
<i>Activation catalytique</i>	
❖ <i>Analyse isotopique de la 5'-désoxyadénosine</i>	
<i>Purification de la 5'-désoxyadénosine</i>	
<i>Détermination du pourcentage de deutération</i>	
❖ <i>Bilan</i>	
<i>B.I.2.b - Deuxième étude</i>	152
❖ <i>Préparation de la protéine αGlyD</i>	
❖ <i>Caractérisation structurale de la protéine αGlyD</i>	
❖ <i>Activation de la protéine αGlyD</i>	
❖ <i>Analyse isotopique de la 5'-désoxyadénosine</i>	
<i>Purification de la 5'-désoxyadénosine</i>	
<i>Détermination du pourcentage de deutération</i>	
B.I.3 - DTT, zinc et formation du radical glycinyle.....	159
<i>B.I.3.a - Influence du DTT</i>	159
<i>B.I.3.b - Influence du zinc</i>	160
C - Stabilité du radical glycinyle	160
C.I - Taux d'incorporation du radical Gly[•] dans la protéine α	161

C.II - Influence de quelques facteurs sur la stabilité du radical Gly[•]	163
C.II.1 - Effet du système thiorédoxine	163
C.II.2 - Effet de l'ATP	164
C.II.3 - Effet des mutations	165
<i>C.II.3.a - Etude du mutant αC680A.....</i>	<i>165</i>
<i>C.II.3.b - Etude des mutants αC644A et αC662A</i>	<i>168</i>
D – Discussion	169
D.I – Formation et stabilité du radical glycinyle.....	169
D.II - Rôle du DTT	173
 - CONCLUSION GENERALE -	 176
 - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -	 180

Abréviations et Notations

Å.....	Ångström
Ad.....	adénine
ADN.....	acide désoxyribonucléique
Ado [•]	radical 5'-désoxyadénosyle
AdoH.....	5'-désoxyadénosine hydrogénée
AdoCbl.....	adénosylcobalamine
AdoD.....	5'-désoxyadénosine deutérée
AdoMet (SAM).....	S-adénosyl-L-méthionine
Ala.....	alanine
« apo α ».....	protéine α démétallée
APS.....	persulfate d'ammonium
ARN.....	acide ribonucléique
aRNR.....	ribonucléotide réductase anaérobie
aRNR-AE.....	activase de la ribonucléotide réductase anaérobie
AS.....	activité spécifique
ATP.....	adénosine triphosphate
αCo.....	protéine α contenant du cobalt dans le site métallique
αGlyD.....	protéine α dont les glycines sont deutérées sur le carbone α
αGlyD ^{réd}	protéine αGlyD réduite par le système thiorédoxine
αC680AglyD.....	protéine αC680A dont les glycines sont deutérées sur le carbone α
BBP.....	bleu de bromophénol
BET.....	bromure d'éthidium
BioB.....	biotine synthase
BPS.....	bathophénanthroline sulfonate
BSS.....	benzylsuccinate synthase
BT.....	bipyramide trigonale
β ^{réd}	protéine β réduite chimiquement ou photochimiquement
CLHP.....	chromatographie liquide haute performance
cm.....	centimètre

(³ H)-CTP	cytidine 5'-triphosphate tritiée en position C8
Cys.....	cystéine
5-DAF	5-déaza-7,8-déméthyl-10-méthyl-isoalloxazine
dATP	2'-désoxyadénosine 5'-triphosphate
°C	degré Celsius
CMP	cytidine 5'-monophosphate
Cys [•]	radical cystéinyle
Da	dalton
DCC	dicyclohexylcarbodiimide
dCMP	2'-désoxycytidine 5'-monophosphate
(³ H)-dCMP	2'-désoxycytidine 5'-monophosphate tritiée en position C8
dCTP	2'-désoxycytidine 5'-triphosphate
DEAE	déthylaminoéthanol
DMF	diméthylformamide
DNase	désoxyribonucléase
dNTP	2'-désoxyribonucléoside 5'-triphosphate
DO	densité optique
dpm.....	désintégration par minute
DTT	dithiothréitol
δ.....	déplacement isomérique
ΔDO.....	différence de densité optique
ΔE _Q	éclatement quadrupolaire
Δε.....	différence de coefficient d'extinction molaire
E	énergie
E ^{'0}	potentiel standard apparent
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
ε.....	coefficient d'extinction molaire
ENDOR	double résonance électronique et nucléaire

ENH.....	électrode normale à hydrogène
Fldx	flavodoxine
Fldx ^{ox}	flavodoxine oxydée
Fldx ^{réd}	flavodoxine réduite
FNR	fumarate nitrate réductase
(² H, ² H)-glycine.....	glycine deutérée sur le carbone α
g.....	gramme / tenseur
GAO	galactose oxydase
GDH.....	glycérol déshydratase
GDP.....	guanosine diphosphate
g _e	facteur de Landé
GHz	gigahertz
Gly [•]	radical glycinyle
GlyD [•]	radical glycinyle deutéré
h.....	constante de Planck
H.....	hamiltonien
HemN	coproporphyrinogène III oxydase
HPD.....	4-hydroxyphénylacétate décarboxylase
HQ	hydroquinone
¹ H-RMN	résonance magnétique nucléaire du proton
HYSCORE.....	« hyperfine sublevel correlation spectroscopy »
I	spin nucléaire
IPTG.....	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
K	kelvin
<i>K_a</i>	constante d'association
kb.....	kilobase
kcal	kilocalorie
<i>K_d</i>	constante de dissociation
kDa	kilodalton

Kpi.....	phosphate de potassium
kV.....	kilovolt
L.....	litre
LAM.....	lysine 2,3-aminomutase
LB.....	Luria Bertani
<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. leichmannii</i>	<i>Lactococcus leichmannii</i>
M.....	molaire
mA.....	milliampère
MALDI-TOF.....	“matrix assisted laser desorption ionization – time of flight”
mbar.....	millibar
MM _{app}	masse moléculaire apparente
mg.....	milligramme
min.....	minute
mm.....	millimètre
mL.....	millilitre
mM.....	millimolaire
m _s	moment de spin
mT.....	millitesla
m/z.....	masse sur charge
µg.....	microgramme
µL.....	microlitre
µM.....	micromolaire
µW.....	microwatt
n°.....	numéro
NADP ⁺	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé
NADPH.....	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NBD-Cl.....	7-chloro-2-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole
NDP.....	nucléoside 5'-diphosphate

NTP	nucléoside 5'-triphosphate
ng	nanogramme
nm	nanomètre
nmole	nanomole
ns	nanoseconde
v	fréquence
P _{1/2}	puissance de demi-saturation
PAR	4-(2-pyridylazo)résorcinol
PCA	acide perchlorique
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
pdb	paire de bases
PFL	pyruvate formiate-lyase
PFL-AE	activase de la pyruvate formiate-lyase
PMB	<i>para</i> -hydroxymercuribenzoate
pmole	picomole
PMSF	fluorure de phénylméthylsulfonyl
ppm	partie par million
p/v	poids/volume
R [•]	radical organique
R _f	facteur de rétention
RMN	résonance magnétique nucléaire
RMN 2D	résonance magnétique nucléaire bidimensionnelle
RNase	ribonucléase
RNR	ribonucléotide réductase
ROO [•]	radical peroxy
RPE	résonance paramagnétique électronique
rpm	rotation par minute
s	seconde
S	spin électronique

S [•]	radical thiyle
SAM (AdoMet)	S-adénosyl-L-méthionine
SDS	dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE.....	gel d'électrophorèse
SDX.....	superdex
SPL.....	spore photoproduct lyase
SQ.....	semiquinone
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
t _{1/2}	temps de demi-vie
T1	temps de relaxation spin-réseau
T2	temps de relaxation spin-spin
TAE.....	tris acétate EDTA
TB.....	« terrific broth »
TCA.....	acide trichloroacétique
TEAB	bicarbonate de triéthylammonium
TFA	acide trifluoroacétique
TIM	triose phosphate isomérase
TNB.....	2-nitro-5-thiobenzoate
TPEN.....	tétrakis-(2-pyridylméthyl)éthylènediamine
Tris	tris-hydroxyméthyl-aminométhane
Trx	thiorédoxine
Trr.....	thiorédoxine réductase
Tyr [•]	radical tyrosinyle
U	unité
UV	ultraviolet
V	volt
v/v.....	volume/volume

Introduction

bibliographique

A - Les protéines radicalaires

A.I - Identification et propriétés des radicaux protéiques

En 1977 Sjöberg *et al.* ont démontré que le radical organique nécessaire à la réduction des ribonucléotides par la ribonucléotide réductase aérobie d'*E. coli* provient de l'oxydation à un électron d'un résidu tyrosine de la chaîne polypeptidique (Sjöberg 1977). Dès lors, d'autres radicaux stables ou transitoires ont été identifiés sur des résidus glycine, cystéine, tyrosine et tryptophane. Le tableau A.1 présente les structures de ces radicaux.

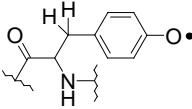
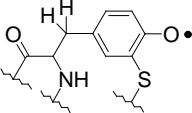
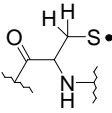
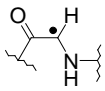
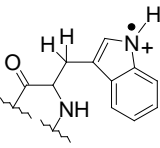
Acide aminé	Système enzymatique	Structure du radical	Découverte
Tyrosine	RNR de classe I Photosystème II Prostaglandine H synthase		Sjöberg 1977 Barry 1987 Karthein 1988
Tyrosine modifiée	Galactose oxydase		Whittaker 1990
Cystéine	RNR de classe II		Licht 1996
Glycine	RNR de classe III Pyruvate formate-lyase		Mulliez 1993 Wagner 1992
Tryptophane	Cytochrome c peroxydase		Sivaraja 1989

Tableau A.1 - Diversité des radicaux protéiques impliqués dans la catalyse radicalaire. RNR = ribonucléotide réductase.

La méthode biophysique de choix pour l'étude des radicaux protéiques est la spectroscopie de RPE. Le marquage isotopique spécifique des protéines combiné à la production de mutants appropriés constitue une approche classiquement employée qui permet de faciliter l'identification et la caractérisation des radicaux. Il est parfois nécessaire d'utiliser des techniques complémentaires telles que la spectroscopie ENDOR pour identifier le radical de manière définitive lorsque celui-ci est instable, transitoire ou se comporte de manière inhabituelle en raison d'une interaction avec un centre métallique voisin.

L'environnement protéique peut induire une modification drastique des potentiels d'oxydoréduction des radicaux et donc du type de réactivité chimique accessible. Par exemple, le centre réactionnel photosynthétique II contient deux radicaux tyrosinyles dont les potentiels rédox varient de 750 à 1000 mV (Vass 1991, Boussac 1984). La galactose oxydase possède une tyrosine modifiée par une cystéine liée covalamment par son groupe thiol en position ortho de l'hydroxyle (Tableau A.1). Il en résulte une diminution de 600 mV du potentiel rédox généralement observé pour les radicaux tyrosinyles de peptides modèles (Johnson 1985). L'étude de tels peptides modèles comportant des acides aminés modifiés devrait permettre de mieux comprendre les effets de l'environnement protéique sur les potentiels rédox des radicaux. Des mesures complémentaires par électrochimie effectuées sur les protéines elles-mêmes sont également requises ; l'instabilité des radicaux protéiques, bien que moins marquée par rapport à celle des radicaux générés au sein de modèles, peut toutefois poser problème (Stubbe 1998a).

Une autre caractéristique des protéines radicalaires est leur capacité à contrôler l'espèce oxydante qu'elles génèrent. En général, en absence de substrat, la protéine stabilise le radical initialement formé dans une région hydrophobe enfouie du site actif. C'est ainsi que le radical glycinyle de la RNR de classe III est fortement stabilisé en absence de substrat ($t_{1/2} > 24$ h) ; de même le radical tyrosinyle de la RNR de classe I a une stabilité chimique inhabituelle ($t_{1/2} = 4$ jours) en comparaison de celle du radical tyrosinyle en solution dont le $t_{1/2}$ est de l'ordre de la milliseconde (Stubbe 1998b). De manière opposée le radical cystéinyle de la RNR de classe II ($t_{1/2} \sim 1$ h, 37°C) (Yamada 1971) et le radical tyrosinyle de la

prostaglandine synthase ($10\text{ s} < t_{1/2} < 1\text{ min}$) (Stubbe 1998a) sont rapidement réduits en absence de substrat. Lorsque le radical initial est distant du site catalytique, l'activation du substrat nécessite un transfert de radical préalable contrôlé par l'environnement protéique. Ainsi, dans les RNRs de classe I, un transfert d'électron et de proton s'effectue entre l'une des cystéines du site catalytique et le radical tyrosinyle initial, distants d'environ 35 Å , le long d'une chaîne radicalaire impliquant certains acides aminés (Stubbe 2003). La grande réactivité des espèces radicalaires générées nécessite la mise en place d'un contrôle strict par l'environnement protéique, selon des mécanismes qui font l'objet de nombreuses investigations.

A.II - Biosynthèse des radicaux protéiques

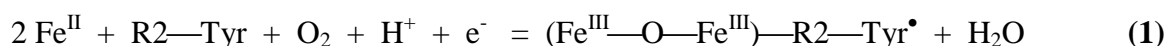
Les radicaux protéiques sont synthétisés selon un processus post-traductionnel qui fait intervenir un cofacteur métallique. Ce cofacteur est situé soit à proximité de l'acide aminé subissant l'oxydation, soit sur une autre protéine appelée enzyme activatrice nécessaire à la formation du radical. Les complexes métalliques utilisés contiennent du fer, du cobalt, du manganèse ou du cuivre (Stubbe 1998a). Le fer en particulier est très représenté et peut être associé à des ligands porphyriniques ou constituer des centres binucléaires ou $[4\text{Fe-4S}]$.

Une exception à la règle selon laquelle la formation d'un radical protéique est toujours associée à l'utilisation d'un cofacteur métallique apparaît avec l'exemple du photosystème II. Le radical tyrosinyle Y_Z^\bullet du photosystème II résulte de l'oxydation de la tyrosine par un complexe chlorophyllien ($\text{P680}^{\bullet+}$) préalablement photoactivé puis oxydé par une molécule de phéophytine (Barber 2003). Toutefois le radical Y_Z^\bullet est situé à moins de 5 Å du centre tétranucléaire à manganèse impliqué dans l'oxydation de l'eau en oxygène moléculaire (Gilchrist 1995).

Quelques-uns des systèmes générateurs de radicaux protéiques parmi les plus étudiés sont examinés ci-après.

A.II.1 - Fer et oxygène moléculaire

La formation d'un radical tyrosinyle grâce à la combinaison entre un centre binucléaire à fer et l'oxygène moléculaire a été étudiée en détail dans le cas de la ribonucléotide réductase de classe I d'*E. coli* (Bollinger 1991 ; Stubbe 1998 ; Jordan 1998 ; Eklund 2001). L'enzyme est constituée de deux sous-unités homodimériques nommées R1 et R2. La sous-unité R1 contient le site de réduction des ribonucléotides diphosphates. La sous-unité R2 renferme dans sa forme active un centre binucléaire de Fe^{III} à pont μ -oxo et un radical localisé sur la tyrosine 122 (Åberg 1993). La formation du radical tyrosinyle est globalement décrite par l'équation (1).



La forme réduite du centre binucléaire à fer, formée lors de la liaison de deux ions Fe²⁺ à l'apoprotéine, est l'espèce qui active l'oxygène moléculaire pour générer le radical Tyr[•]. La réduction de l'oxygène en eau nécessite la mobilisation de quatre électrons. Deux proviennent de l'oxydation des atomes de fer, un autre de l'oxydation de la tyrosine (à l'origine du radical protéique) et le dernier d'un réducteur externe tel que le fer(II) (Covès 1997).

Les structures cristallographiques de la protéine R2 sous forme Fe^{III}-Fe^{III} (Nordlund 1990, Nordlund 1993 ; Högbom 2003), apo (Åberg 1993) et Fe^{II}-Fe^{II} (Logan 1996) ainsi que de nombreuses études biochimiques et spectroscopiques ont favorisé l'émergence de plusieurs propositions décrivant le mécanisme de formation du radical tyrosinyle (Sahlin 1990 ; Stubbe 1990 ; Bollinger 1991 ; Que 1996 ; Logan 1996 ; Andersson 1999). L'une d'elles est présentée sur la figure A.1. Dans la protéine R2 réduite les ions Fe^{II} tétracoordinés sont distants de 3,9 Å et reliés entre eux par des ponts carboxylato bidentates provenant de deux résidus glutamates.

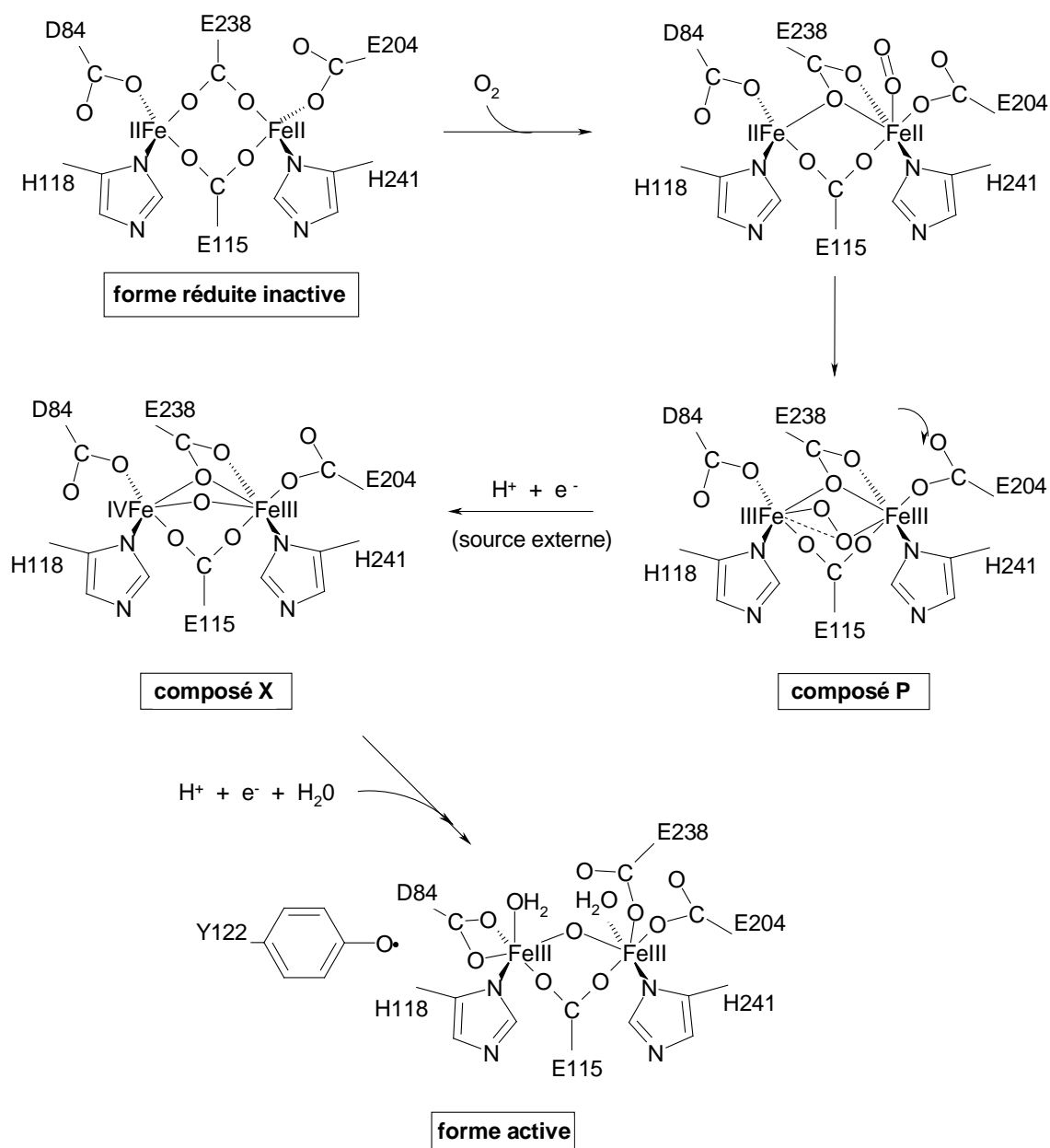


Figure A.1 - Mécanisme proposé pour la formation du radical tyrosinyle des RNRs de classe I. La forme réduite inactive de R2 résulte de la chélation de 2 ions ferreux par la protéine apoR2. L'oxygène moléculaire complexé est réduit à deux électrons par le centre binucléaire pour former un intermédiaire peroxo (composé P). La réduction couplée à une protonation du peroxo conduit au composé X. La réduction à un électron de ce dernier par la tyrosine adjacente mène à la forme active de R2. La numérotation indiquée est celle de l'enzyme d'*E.coli*. D'après Andersson, 1999.

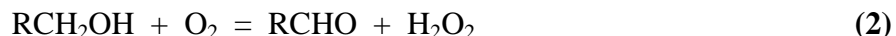
La première étape de la réaction est la formation d'un complexe entre le centre réduit et l'oxygène. Un tel complexe n'a pu être observé dans le cas de la RNR ; des cristaux de

protéine R2 contenant une molécule d'azide liée au centre métallique ont été obtenus avec un mutant de la RNR d'*E. coli* (Andersson 1999). La structure montre que la liaison de l'azide à l'atome de fer le plus éloigné de la tyrosine s'accompagne d'un déplacement du carboxylate du résidu E238. Le centre binucléaire de Fe^{II} réagit ensuite avec l'oxygène moléculaire pour produire un intermédiaire de type peroxo ou composé P qui n'a été observé que dans des complexes modèles (MacMurdo 2000) ou dans des mutants de R2 (Bollinger 1998 ; Moenne-Loccoz 1998). La réduction couplée à une protonation de ce centre binucléaire de Fe^{III} à pont μ -peroxo conduit à un deuxième intermédiaire ou composé X au sein duquel les deux atomes de fer sont distants de 2,5 Å (Riggs-Gelasco 1998), décrit formellement comme une espèce à valence mixte $\text{Fe}^{\text{III}} \text{Fe}^{\text{IV}}$ (Sturgeon 1996). Enfin l'intermédiaire X oxyde la tyrosine voisine, conduisant à la forme active de la protéine qui contient un centre $\text{Fe}^{\text{III}} \text{Fe}^{\text{III}}$ à pont μ -oxo et le radical tyrosinyle. Un troisième intermédiaire appelé composé U contenant un radical tryptophanyle protoné couplé à un centre $\text{Fe}^{\text{III}} \text{Fe}^{\text{IV}}$ a été proposé. Ce radical situé sur le résidu W48 a été observé lorsque la reconstitution de la protéine est menée dans des conditions d'apport limité en fer (Baldwin 2000 ; Krebs 2000). L'intermédiaire U serait formé suite à la réaction de rupture du pont peroxo mettant en jeu deux électrons, l'un issu du tryptophane et l'autre d'un atome de fer.

Le centre binucléaire à fer décrit précédemment n'est pas spécifiquement associé à la RNR de classe I ; de nombreuses protéines telles que la méthane mono-oxygénase contiennent des centres très semblables, adoptent un repliement similaire et utilisent la coupure de l'oxygène moléculaire pour initier la catalyse (Waller 1996 ; Solomon 2000).

A.II.2 - Cuivre et oxygène moléculaire

Certaines protéines utilisent la combinaison entre un centre métallique à cuivre et l'oxygène moléculaire pour former un radical protéique. C'est le cas de la galactose oxydase (GAO), une enzyme à cuivre qui catalyse l'oxydation du D-galactose et des alcools primaires en leurs aldéhydes correspondants selon la réaction (2).



Cette enzyme est assez inhabituelle dans le sens où elle catalyse une réaction rédox à deux électrons à l'aide d'un centre métallique mononucléaire à cuivre. Dans ce contexte, il a été proposé que la GAO possède dans son site actif un deuxième cofacteur agissant comme un centre rédox monoélectronique (van der Meer 1989 ; Whittaker 1988, Whittaker 1989, Whittaker 1990). La résolution de la structure cristallographique de la GAO (Ito 1991) a confirmé cette hypothèse : un cofacteur organique dérivé de la Tyr 272 et de la Cys 228 coordine directement l'ion Cu(II) par son groupe phénolate comme le montre la figure A.2. Ce cofacteur sert de centre rédox monoélectronique en passant par les états phénolate et radical phénoxy au cours du cycle catalytique d'oxydation de l'alcool.

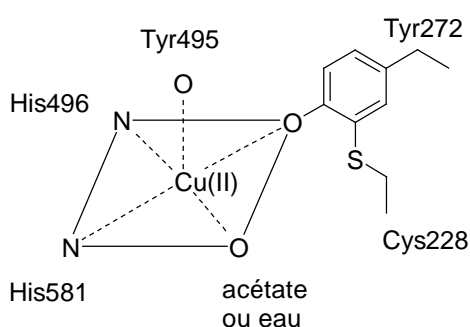


Figure A.2 - Le complexe cuivrique de la galactose oxydase de *Fusarium*. Un adduit covalent entre la tyrosine 272 et la cystéine 228 constitue l'un des ligands du cuivre.

L'espèce active (état totalement oxydé) de la GAO est un complexe Cu(II)-radical phénoxy qui oxyde l'alcool au cours d'un processus dans lequel interviennent 2 électrons/protons pour former l'aldéhyde correspondant et l'espèce Cu(I)-phénolate (forme totalement réduite) (Whittaker 1993).

Le mécanisme de formation du radical tyrosinyle de la GAO est moins bien compris que celui de la RNR de classe I. Il semble que le cuivre soit non seulement nécessaire à la synthèse du pont thioéther du cofacteur mais également à la formation du radical Tyr[•] en

association avec l'oxygène (Whittaker 1998 ; Rogers 2001 ; Firbank 2001). Le mécanisme proposé pour cette dernière réaction est présenté sur la figure A.3.

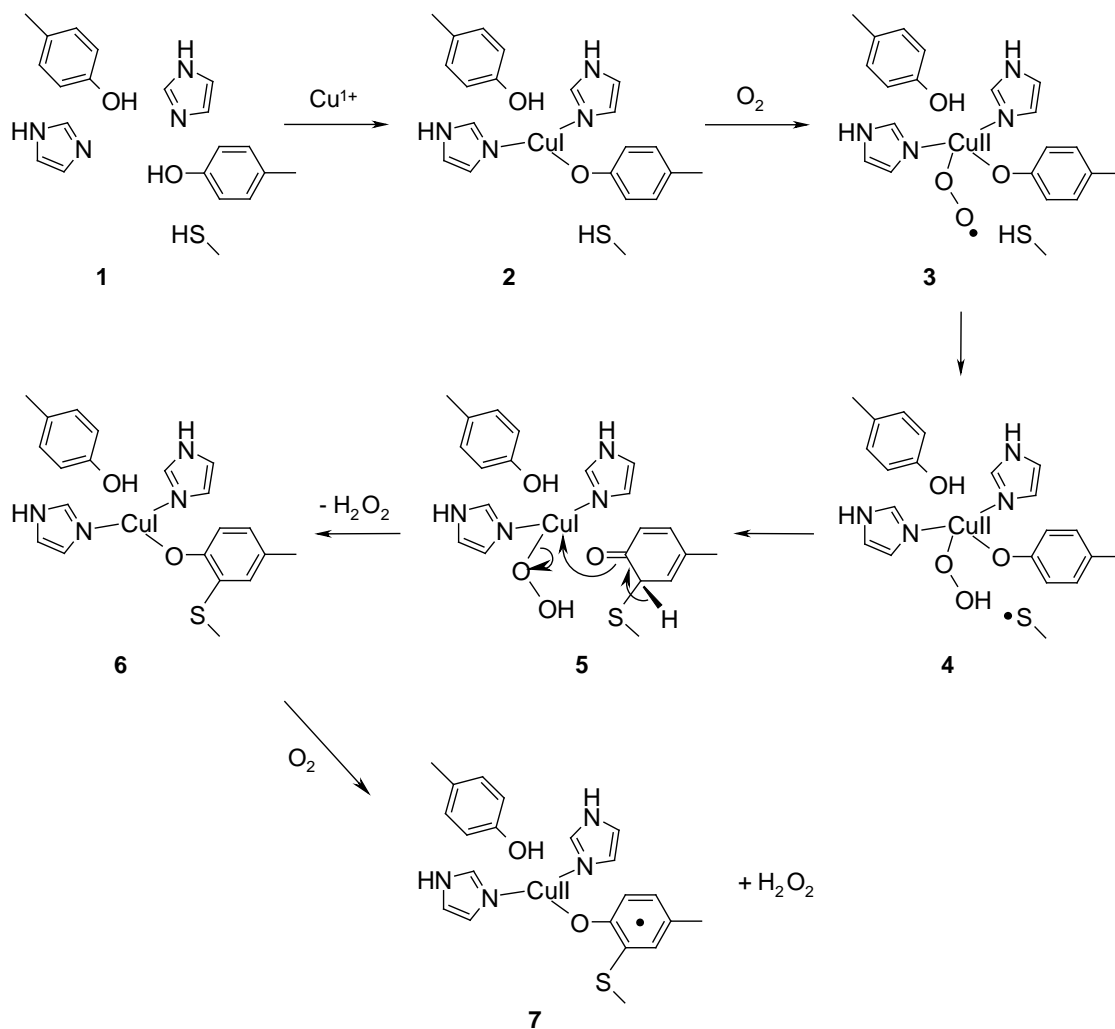


Figure A.3 - Mécanisme proposé pour la formation du radical tyrosinyle modifié de la galactose oxydase. L'ion Cu^{1+} se lie au site actif pré-organisé (1) pour former un complexe métallique réduit (2). L'oxygène moléculaire réagit directement avec le centre, ce qui conduit à un intermédiaire oxygéné réactif (3) capable d'arracher un atome d'hydrogène de la cystéine 228 et ainsi de former un radical thiyle (4). L'addition du radical au cycle de la tyrosine 272 (5) et la perte d'un proton permettent de restaurer l'aromaticité du cycle et de réduire le cuivre à un électron (6). Enfin la réaction d'une seconde molécule d'oxygène mène à la formation du complexe métallique radicalaire (7). D'après Whittaker 2005.

Une autre enzyme, la glyoxal oxydase, catalyse l'oxydation d'aldéhydes en acides. Des expériences de résonance Raman ont montré que la protéine contient un radical tyrosinyle modifié couplé à un ion Cu(II) et suggèrent que l'adduit Cys-Tyr sous forme radicalaire pourrait être un cofacteur représentatif d'une famille d'oxydases à cuivre (Stubbe 1998a).

A.II.3 - L'adénosylcobalamine (coenzyme B12)

L'adénosylcobalamine est un cofacteur complexe dont la structure est représentée sur la figure A.4.

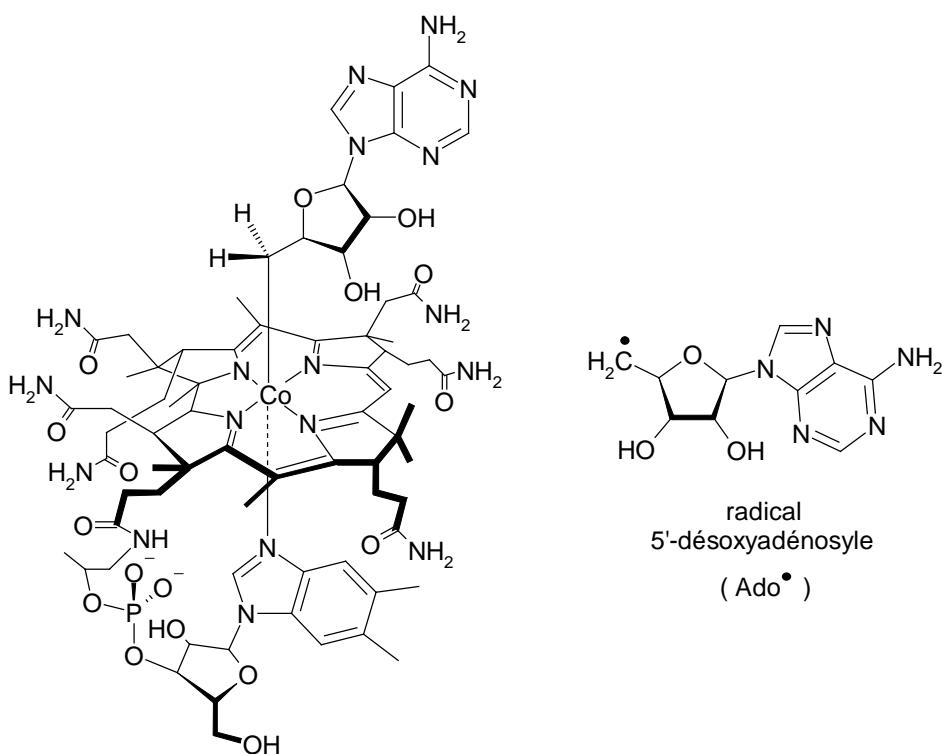


Figure A.4 - Structures de l'adénosylcobalamine (AdoCbl, gauche) et du radical 5'-désoxyadénosyle issu de l'homolyse de la liaison Co-C de l'AdoCbl (droite). Au centre de l'AdoCbl se trouve un atome de cobalt (Co) coordonné à 4 atomes d'azote pyrroliques situés dans le plan équatorial. Le ligand 5'-désoxyadénosyle est situé en *cis* et le ligand en *trans* est une base volumineuse, le diméthylbenzimidazole, relié à un noyau pyrrole par une chaîne ribofuranosyle. Dans les enzymes AdoCbl-dépendantes, le ligand en *trans* peut-être le diméthylbenzimidazole (base-on) ou un résidu histidine de la protéine (base-off ou his-on).

La liaison $\text{Co}-\text{C}_{5'}$ de l'adénosylcobalamine possède une faible énergie de dissociation, de l'ordre de 30 kcal mol^{-1} (Halpern 1984 ; Finke 1984). Le potentiel de rupture homolytique de cette liaison est une propriété essentielle de l'adénosylcobalamine, qui constitue une source de radicaux 5'-désoxyadénosyles utilisés par de nombreuses enzymes pour initier une catalyse radicalaire (Frey 1990). Le gain d'énergie associé à la fixation du substrat et du cofacteur par l'enzyme partenaire permet l'accélération de la réaction de coupure de la liaison $\text{Co}-\text{C}_{5'}$ par un facteur de 10^{12} environ (Finke 1990).

Le radical 5'-désoxyadénosyle (Ado^\bullet), qui n'a jamais été observé directement, est utilisé de deux manières différentes. La plupart des enzymes adénosylcobalamine-dépendantes catalysent des réactions d'isomérisation ; dans ces systèmes le radical Ado^\bullet arrache un atome d'hydrogène spécifique du substrat qui subit par la suite un réarrangement radicalaire menant au produit. Le radical Ado^\bullet peut également oxyder un résidu cystéine de la protéine pour donner une molécule de 5'-désoxyadénosine et un radical cystéinyle qui oxyde ensuite le substrat. Il a ainsi été montré que dans la RNR de classe II la 5'-désoxyadénosine et la cob(II)alamine se forment de manière concomitante et que le radical cystéinyle est en interaction d'échange et dipolaire avec la cob(II)alamine (Licht 1996 ; Gerfen 1996). La distance entre le radical Cys^\bullet et la cob(II)alamine a été estimée à 5-7 Å. La figure A.5 schématise la formation du radical Cys^\bullet des RNRs de classe II, en accord avec les différentes études réalisées.

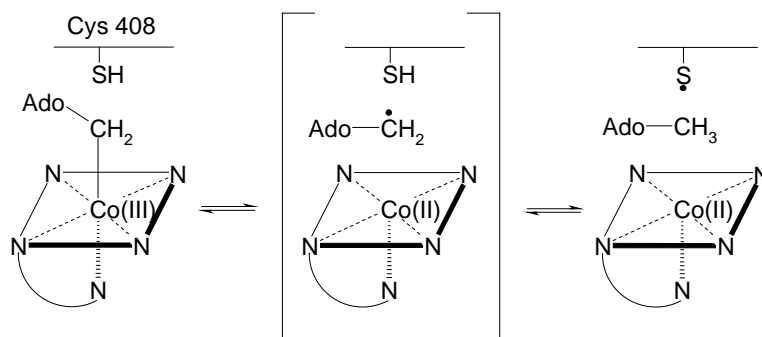


Figure A.5 - Formation du radical thiyle des RNRs de classe II.

La distance entre le radical Cys^\bullet et la cob(II)alamine est estimée à 5-7 Å.

Les radicaux adénosyles peuvent être générés d'une autre manière, à partir de l'action conjointe de deux cofacteurs, la *S*-adénosylméthionine et un centre [4Fe-4S] particulier. Cette chimie récemment découverte (Frey 1990) et mise en œuvre par de nombreuses enzymes fait l'objet du paragraphe suivant.

A.II.4 – Centre [4Fe-4S] et *S*-adénosylméthionine

Les centres fer-soufre constituent l'un des plus anciens groupes prosthétiques biologiques et assument des fonctions variées. Ils ont été à l'origine reconnus comme médiateurs dans les réactions d'oxydoréduction à un électron associées aux processus fondamentaux que sont la respiration et la photosynthèse.

Une nouvelle fonction pour les centres fer-soufre est apparue avec l'identification d'un nombre croissant d'enzymes utilisant un centre [4Fe-4S] en combinaison avec la *S*-adénosylméthionine (SAM ou AdoMet) pour initier une catalyse radicalaire. Ces enzymes appartiennent à une superfamille appelée « Radical SAM », dont les membres présents dans les trois domaines du vivant ont développé un mécanisme conservé permettant la réalisation de réactions chimiquement difficiles (Sofia 2001). Les protéines Radical SAM catalysent des réactions diverses telles que des méthylations inhabituelles, isomérisations, cyclisations, oxydations, insertions de soufre ou encore la formation de radicaux protéiques. Elles sont impliquées à la fois dans des voies de biosynthèse (précurseurs de l'ADN, vitamines, cofacteurs, antibiotiques, herbicides) et de biodégradation très étudiées jusqu'alors mais non encore totalement élucidées. Malgré la diversité des réactions catalysées par les enzymes Radical SAM, il est estimé que ces protéines procèdent par un mécanisme commun de génération des espèces radicalaires, dont les étapes sont représentées sur la figure A.6.

La première étape est la réduction du centre [4Fe-4S]²⁺ lié à la protéine par un réducteur cellulaire tel que le système NADPH : flavodoxine : flavodoxine réductase. Le transfert mono-électronique du centre réduit à la SAM provoque ensuite la coupure homolytique de la liaison S—C₅· du sulfonium, conduisant à la production d'une molécule de

méthionine et d'un radical 5'-désoxyadénosyle (Ado^\bullet) hautement réactif. Enfin, le radical Ado^\bullet arrache un atome d'hydrogène du substrat (petite molécule ou résidu glycine d'une autre protéine) pour former un radical substrat R^\bullet . Les étapes consécutives à cette dernière réaction sont spécifiques à chaque enzyme de la superfamille.

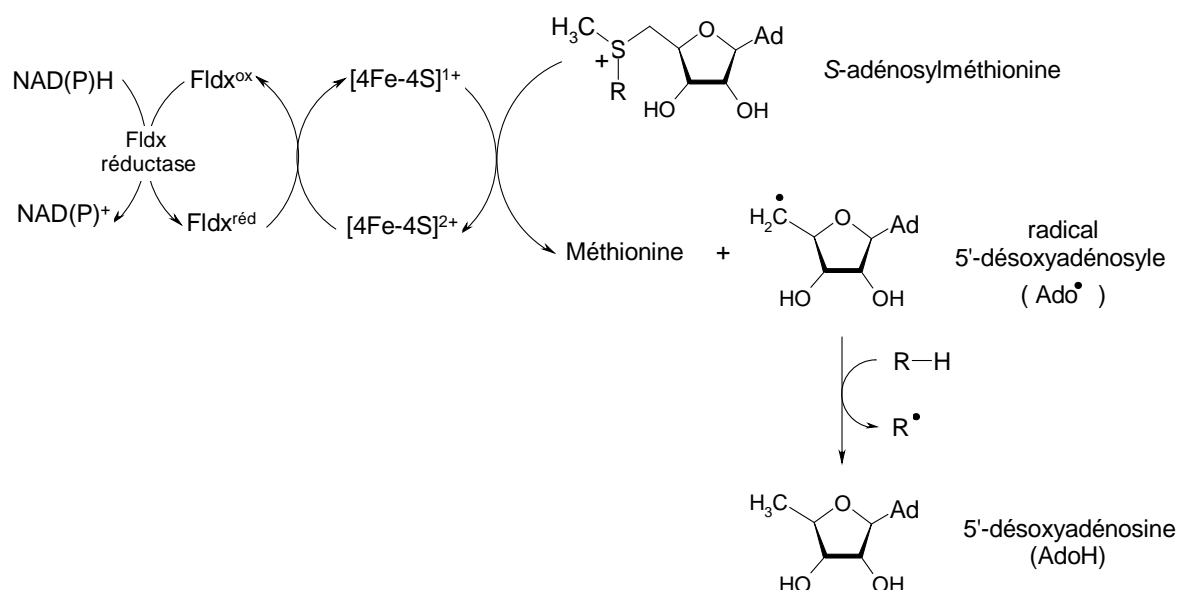


Figure A.6 - Les premières étapes réactionnelles d'initiation de la catalyse radicalaire par les enzymes de la superfamille Radical SAM. Le centre $[\text{4Fe-4S}]^{1+}$ est l'espèce active qui catalyse la réductolyse de la SAM pour donner une molécule de méthionine et un radical 5'-désoxyadénosyle postulé très réactif. Ce radical Ado^\bullet oxyde un substrat R-H pour former un radical substrat R^\bullet . Ad = adénine ; Fldx = flavodoxine.

Le centre $[\text{4Fe-4S}]$ des protéines Radical SAM est atypique. En effet seules trois cystéines assurent sa coordination ; ces cystéines appartiennent au motif caractéristique CXXXCXXC (où X représente un acide aminé non conservé), commun à toutes les enzymes de la superfamille. La figure A.7 montre un alignement de séquences limité au motif de liaison du centre fer-soufre d'une sélection d'enzymes Radical SAM.

SPL	F	A	T	G	C	M	G	H	C	H	Y	C	Y	L	Q
PFL-AE	F	F	Q	G	C	L	M	R	C	L	Y	C	H	N	R
LAM	I	T	D	M	C	S	M	Y	C	R	H	C	T	R	R
aRNR-AE	F	V	T	G	C	L	H	K	C	E	G	C	Y	N	R
BioB	K	T	G	A	C	P	Q	D	C	K	Y	C	P	Q	T
HemN	H	I	P	F	C	H	K	L	C	Y	F	C	G	C	N

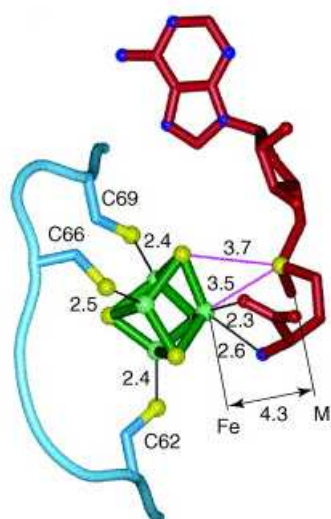
Figure A.7 - Motifs de liaison du centre [4Fe-4S] de quelques-unes des protéines Radical SAM les plus étudiées. SPL : spore photoproduct lyase de *B. subtilis* ; PFL-AE : activase de la pyruvate formiate-lyase d'*E. coli* ; LAM : lysine 2,3-aminomutase de *C. subterminale* ; aRNR-AE : activase de la ribonucléotide réductase anaérobie d'*E. coli* ; BioB : biotine synthase d'*E. coli* ; HemN : coproporphyrinogène III oxydase d'*E. coli*.

Les structures cristallographiques de quatre protéines Radical SAM ont successivement été déterminées entre 2003 et 2005, révélant l'organisation spatiale du centre [4Fe-4S] et de la SAM (Layer 2003 ; Berkovitch 2004 ; Hanzelmann 2004 ; Lepore 2005). Dans toutes les structures le centre fer-soufre est lié par les trois cystéines du motif conservé CXXXCXXC ; la coordination bidentate du quatrième atome de fer par l'atome d'azote du groupe amino et par un atome d'oxygène du carboxylate de la SAM, représentée sur la figure A.8, est invariablement observée.

Les quatre protéines possèdent un cœur dérivé d'un arrangement en tonneau TIM (pour Triose Phosphate Isomérase), une structure de type $(\alpha\beta)_8$ commune à de nombreuses protéines dans laquelle un anneau interne à 8 brins β parallèles est entouré d'une couronne de 8 hélices α (Murzin 1995). Le centre [4Fe-4S] se positionne à l'intérieur du tonneau, à proximité de l'axe central. Les structures disponibles confirment et étendent les données biochimiques et spectroscopiques obtenues lors des études antérieures menées sur la LAM, la PFL et la biotine synthase, en particulier en ce qui concerne le mode de coordination de la

SAM au centre [4Fe-4S] (Cosper 2000 ; Cosper 2002 ; Krebs 2002 ; Walsby 2002a ; Walsby 2002b ; Chen 2003).

A



B

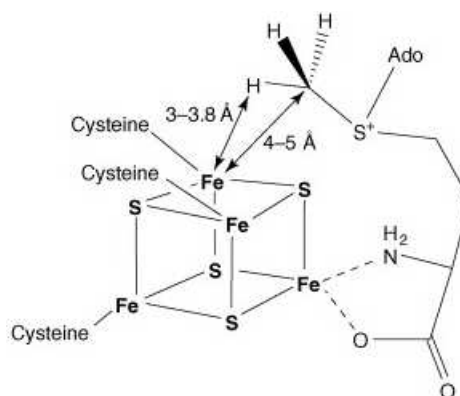


Figure A.8 - Coordination de la SAM au centre [4Fe-4S] des enzymes Radical SAM. A, organisation du centre [4Fe-4S], des 3 cystéines conservées et de la SAM déduite de la structure cristallographique de la protéine HemN ; les atomes de soufre, fer et azote sont respectivement représentés par des sphères jaunes, vertes et bleues. B, modèle dérivé des études spectroscopiques. D'après Layer 2004.

La réaction globale catalysée par les enzymes Radical SAM fait intervenir un radical 5'-désoxyadénosyle intermédiaire issu de la réductolyse de la SAM. La liaison soufre-carbone de la SAM est plus forte que la liaison cobalt-carbone de l'adénosylcobalamine (60 kcal mol^{-1} à comparer à 30 kcal mol^{-1}), et sa rupture homolytique nécessite une réduction monoélectronique préalable médiée par le centre [4Fe-4S] coordonnant la SAM. Il a été démontré dans le cas de la LAM, de la PFL et de l'activase de la RNR anaérobie que le centre [4Fe-4S]¹⁺ est l'espèce active permettant la production du radical Ado[•] (Wu 2000 ; Henshaw 2000 ; Padovani 2001). Le radical adénosyle transitoire n'a jamais été détecté directement du fait de sa très grande réactivité ; cependant Frey *et al.* ont observé et caractérisé un radical allylique stabilisé, représenté sur la figure A.9, lors de la réaction de la LAM en présence de lysine et de 3'-4'-anhydroadénosylméthionine, un analogue de la SAM (Magnusson 2001).

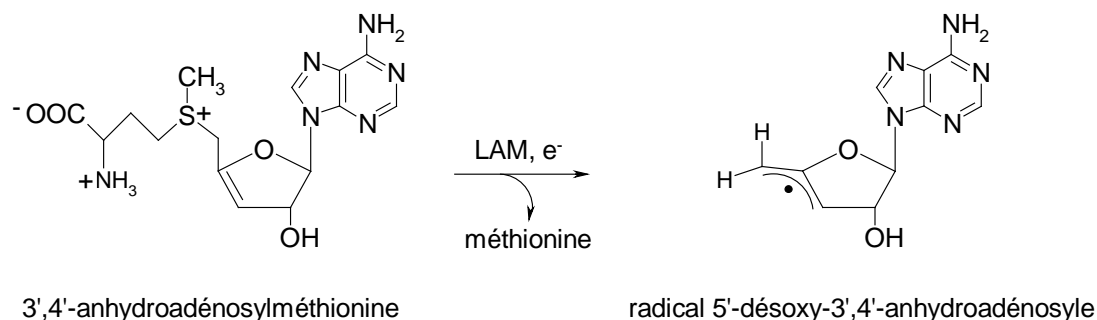


Figure A.9 - Formation du radical 5'-désoxy-3',4'-anhydroadénosyle.

Une autre indication en faveur de l'existence du radical Ado^\bullet a été apportée par l'équipe de Knappe. La PFL possède dans sa forme active un radical glycinyle, généré par une autre protéine appelée activase, membre de la famille Radical SAM. Un octapeptide contenant une déshydroalanine à la place de la glycine radicalisable a été synthétisé ; l'analyse du produit de la réaction d'activation par spectrométrie de masse et RMN 2D a montré la formation d'une liaison covalente entre le $\text{C}_{5'}$ de la partie adénosyle et le carbone β du résidu déshydroalanine, comme indiqué sur la figure A.10 (Wagner 1999).

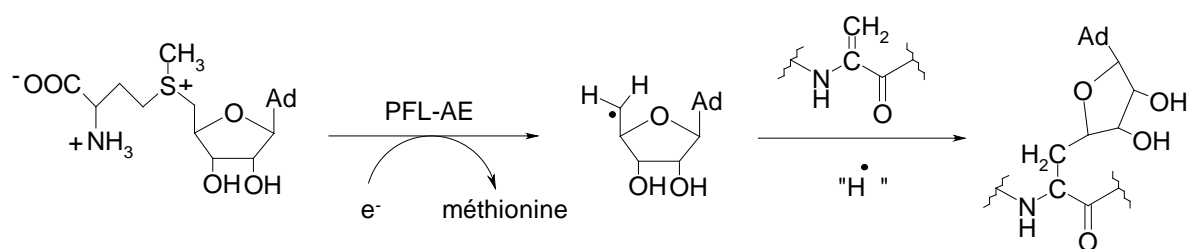


Figure A.10 - Piégeage du radical 5'-désoxyadénosyle. Un octapeptide synthétique contenant une déshydroalanine a été incubé avec l'activase de la PFL en conditions catalytiques. Le mécanisme d'adénosylation de la déshydroalanine implique l'addition du radical 5'-désoxyadénosyle sur la liaison $\text{C}=\text{C}$ de la déshydroalanine suivie de la réduction du radical formé sur le carbone α du résidu. D'après Frey 2001a.

La réduction d'un sulfonium conduisant à la formation d'un radical alkyle et d'un thioéther n'a pas de précédent en biochimie mais a été étudiée par électrochimie. En milieu

organique, la rupture homolytique de la liaison C₅—S de la SAM a lieu à des potentiels rédox de – 1,5 à – 2 V. Il apparaît que les enzymes Radical SAM sont capables de combiner un centre [4Fe-4S] et la SAM de manière inédite pour faciliter la production de radicaux. Des expériences complémentaires sont requises afin de préciser le mécanisme de réductolyse de la SAM.

B - Les protéines à radical glycinyle

B.I - Caractéristiques générales

Les enzymes à radical glycinyle sont des biocatalyseurs qui permettent aux organismes anaérobies stricts ou facultatifs de catalyser des réactions chimiquement difficiles, représentées sur la figure B.1 (Buckel 1998 ; Frey 2001b). La pyruvate formiate-lyase (PFL) et la ribonucléotide réductase anaérobie (aRNR) ont été les deux seuls membres reconnus de cette famille pendant presque dix ans (Eklund 1999). Il est ensuite devenu apparent que les enzymes à radical glycinyle forment un groupe plus important et sont présentes dans les trois domaines du vivant. La caractérisation fonctionnelle de quelques-uns des membres nouvellement identifiés a été entreprise. Il s'agit de la benzylsuccinate synthase (BSS) de *Thauera aromatica* et autres bactéries apparentées (Coschigano 1998 ; Leuthner 1998 ; Beller 1999 ; Leutwein 1999), de la 4-hydroxyphénylacétate décarboxylase (HPD) de *Clostridium difficile* (Selmer 2001) et d'un nouveau type de glycérol déshydratase (GDH) de *Clostridium butyricum* (Raynaud 2003).

Les enzymes à radical glycinyle sont généralement des protéines homodimériques. La masse moléculaire de la sous-unité est comprise entre 80 et 100 kDa. Ces enzymes sont synthétisées sous forme de précurseur inactif ; l'activation post-traductionnelle nécessite l'intervention d'une protéine spécifique à centre fer-soufre appartenant à la famille Radical SAM. Lors de la réaction d'activation, l'atome d'hydrogène *pro-S* d'une glycine strictement conservée est arraché, générant un radical glycinyle stable en anaérobiose (Frey 1994).

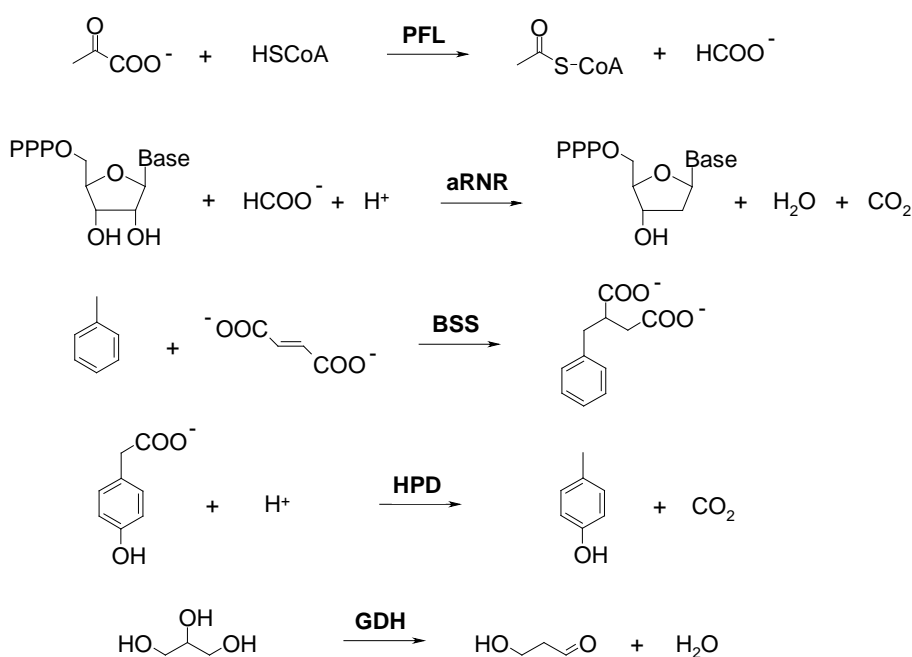


Figure B.1 - Réactions catalysées par quelques enzymes à radical glycinyne.

La glycine catalytique fait partie d'une séquence hautement conservée de la partie C-terminale du polypeptide. Le motif caractéristique RVXG[FWY]X₆₋₈[FL]X₄QX₂[IV]X₂R apparaît dans plus de 90% des séquences de protéines à radical Gly[•] recensées dans la base de données IMG (Selmer 2005). La stabilité inhérente aux radicaux glycinyne est due aux effets combinés des substituants NH et CO respectivement électrodonneur et électroattracteur. Cet effet dit captodatif est illustré par les structures de résonance indiquées sur la figure B.2.

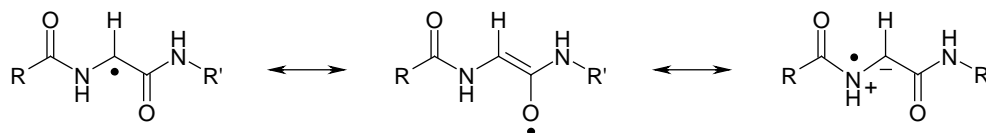


Figure B.2 - Formes mésomères illustrant la stabilisation du radical glycinyne par effet captodatif.

Les signaux RPE des radicaux glycinyles présentent un profil caractéristique, c'est-à-dire un doublet avec un couplage hyperfin de 1,4-1,5 mT centré à $g = 2,0035$ en RPE bande X, et sont tout à fait similaires dans la PFL (Unkrig 1989 ; Wagner 1992), NrdD (Mulliez 1993 ; Young 1996) et la Bss (Krieger 2001 ; Verfurth 2004). Des études de spectroscopie RPE à haute fréquence montrent que l'environnement local du radical Gly \bullet de ces trois enzymes est comparable (Duboc-Toia 2003). En présence d'oxygène, l'enzyme est inactivée en raison de la coupure de la chaîne polypeptidique au niveau du site radicalaire (Wagner 1992). Dans le cas de la PFL il a été montré que l'inactivation s'accompagne de la formation d'un radical peroxyde (ROO \bullet) intermédiaire (Reddy 1998 ; Zhang 2001).

Le cycle catalytique de toutes les enzymes à radical glycinylyle débute probablement par le transfert du radical Gly \bullet sur le groupe thiol d'une cystéine conservée située au milieu de la chaîne polypeptidique et spatialement proche du site glycine radicalaire. Le radical thiyle résultant initie la réaction radicalaire impliquant le substrat spécifique de l'enzyme. Le modèle général de fonctionnement des enzymes à radical Gly \bullet est schématisé sur la figure B.3.

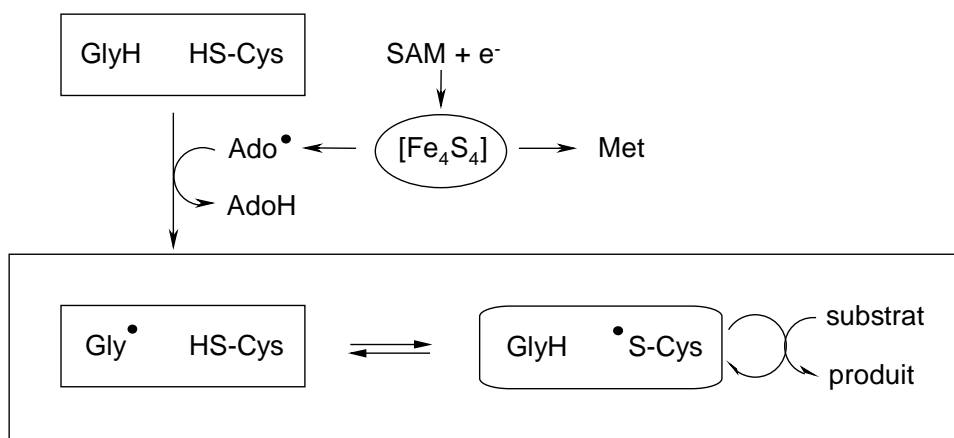


Figure B.3 - Modèle de fonctionnement des enzymes à radical glycinylyle. Le radical issu de la réductolyse de la SAM oxyde une glycine conservée. Le radical Gly \bullet est alors transféré à une cystéine adjacente conservée selon une réaction éventuellement réversible. Le radical thiyle formé est enfin transféré au substrat qui est converti en produit par un mécanisme radicalaire. D'après Knappe 2001.

Les quatre structures cristallographiques d'enzymes à radical Gly[•] disponibles sont celles de la ribonucléotide réductase anaérobie (Logan 1999), de la PFL (Becker 1999), de la GDH (O'Brien 2004) et de la PFL2 (Lehtio 2006). Ces structures sont très similaires ; chaque monomère comporte un cœur en tonneau à dix brins β entouré d'hélices α . De plus, deux boucles dirigées vers le centre du tonneau contiennent respectivement la glycine C-terminale convertie en radical et la cystéine potentiellement impliquée dans le transfert de radical. La proximité des deux résidus conservés conforte le modèle de la figure B.3.

B.II - La ribonucléotide réductase anaérobie

B.II.1 - Les ribonucléotides réductases : présentation générale

Les ribonucléotides sont synthétisés à partir des molécules simples que sont les acides aminés, les dérivés du tétrahydrofolate, le NH_4^+ , le CO_2 et le 5-ribosyl-1-pyrophosphate. Il n'existe pas de telles voies de synthèse pour les désoxyribonucléotides dont la formation *de novo* est assurée par les ribonucléotides réductases (RNRs). Les RNRs sont des enzymes ubiquitaires qui réduisent les quatre ribonucléotides principaux en leurs désoxyribonucléotides correspondants comme indiqué sur la figure B.4. Elles sont essentielles pour la synthèse de l'ADN et donc indispensables à la survie de tout organisme vivant.

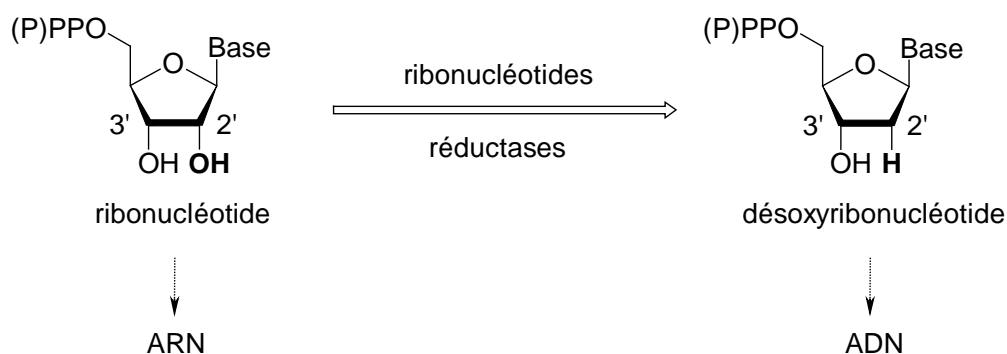


Figure B.4 - Réaction catalysée par les ribonucléotides réductases.

La réaction catalysée par les RNRs n'est pas triviale ; en effet la réduction stéréospécifique d'un ribonucléotide en désoxyribonucléotide est une réaction chimiquement difficile nécessitant l'intervention de radicaux organiques (Reichard 1983). L'arrachement de l'atome d'hydrogène 3' du ribose par un radical cystéinyne transitoire constitue très probablement l'étape d'initiation de la réduction des ribonucléotides commune à toutes les RNRs (Stubbe 1998a ; Eklund 2001). Par contre la manière de produire les radicaux cystéinyles diffère selon l'enzyme considérée. Les RNRs ont ainsi été regroupées en trois classes en fonction du système générateur de radicaux utilisé (Reichard 1993). Les caractéristiques principales des trois classes de RNRs sont regroupées dans le tableau B.1.

	Classe Ia	Classe Ib	Classe II	Classe III
Organismes	Eucaryotes <i>Eubacteria</i> Bactériophages Virus	<i>Eubacteria</i>	<i>Archaea</i> <i>Eubacteria</i> Bactériophages	<i>Archaea</i> <i>Eubacteria</i> Bactériophages
Conditions	Aérobiose	Aérobiose	Aérobiose Anaérobiose	Anaérobiose
Structure	$\alpha_2\beta_2$	$\alpha_2\beta_2$	$\alpha(\alpha_2)$	$\alpha_2\beta_2$
Gènes	<i>nrdAB</i>	<i>nrdEF</i>	<i>nrdJ</i>	<i>nrdDG</i>
Radicaux	Tyr [•] ...Cys [•]	Tyr [•] ...Cys [•]	Ado [•] ...Cys [•]	Ado [•] ...Gly [•] ...Cys [•]
Cofacteur	Fe-O-Fe	Fe-O-Fe	AdoCbl	AdoMet/FeS
Réducteur	Thiorédoxine Glutarédoxine	NrdH-rédoxine Glutarédoxine	Thiorédoxine	Formiate
Substrat	NDP	NDP	NDP/NTP	NTP
Sites allostériques	2	1	1	2
Prototypes	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	(<i>L. leichmannii</i>)	<i>E. coli</i>

Tableau B.1 - Caractéristiques générales des trois classes de ribonucléotides réductases. NDP = ribonucléotides diphosphates ; NTP = ribonucléotides triphosphates.

B.II.2 - La ribonucléotide réductase anaérobie d'*E. coli*

La ribonucléotide réductase anaérobie catalyse la réduction par le formiate des ribonucléotides triphosphates en leurs désoxyribonucléotides correspondants, comme indiqué sur la figure B.5.

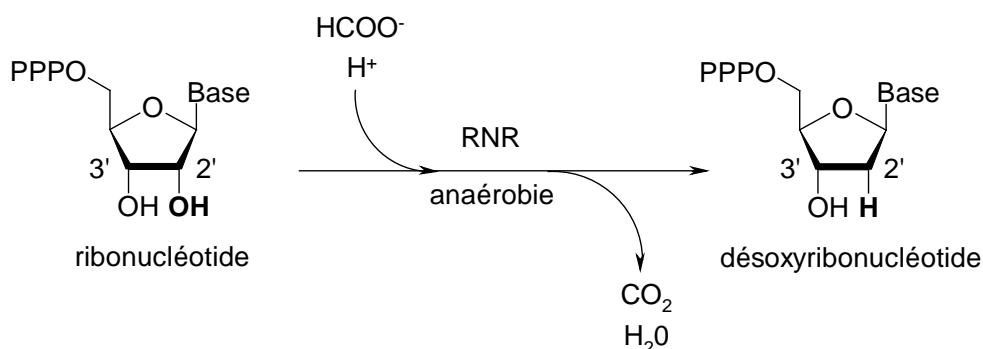


Figure B.5 – Réaction catalysée par les ribonucléotides réductases de classe III.

B.II.2.a - Le système RNR

◆ *Identification des composants du système*

En 1989, un système enzymatique sensible à l'oxygène réduisant les NTPs en dNTPs a été découvert par Fontecave *et al.* dans des extraits cellulaires issus d'une souche d'*E. coli* cultivée en anaérobiose (Fontecave 1989). Des techniques biochimiques de fractionnement et de recombinaison ont ensuite permis d'identifier trois fractions protéiques nécessaires à l'activité enzymatique. L'une d'elles contenait la réductase elle-même, appelée protéine α ou NrdD, en association avec des quantités significatives d'une petite protéine ; la deuxième fraction contenait une protéine impliquée dans les transferts d'électrons, la NADPH : flavodoxine oxydoréductase. Le substrat de la flavodoxine réductase, la flavodoxine, constituait la troisième fraction (Eliasson 1992 ; Sun 1995 ; Bianchi 1993 ; Bianchi 1995). En outre il a été montré que plusieurs petites molécules sont nécessaires à la réduction du CTP substrat *in vitro* : il s'agit de la S-adenosylméthionine, des ions K^+ et Mg^{2+} , du dithiothréitol (DTT), de l'ATP et du formiate (Eliasson 1990 ; Eliasson 1992 ; Mulliez 1995).

◆ Organisation génétique

Le gène *nrdD*, d'une longueur de 2136 paires de bases, code pour la protéine α qui comporte 712 acides aminés. Le gène *nrdG* est situé juste en aval du gène *nrdD*, au sein du même opéron, et contrôle l'expression de la petite protéine de 17,5 kDa appelée protéine β , NrdG ou activase, essentielle à l'activation de la protéine α (Sun 1993 ; Sun 1995). L'opéron est probablement régulé par le système Arc/FNR ; en effet un site de fixation pour la protéine FNR, qui contrôle l'expression des gènes du métabolisme anaérobie, est présent dans la région promotrice. Ainsi la synthèse des protéines NrdD et NrdG est réprimée en conditions aérobies et induite par la transition vers un milieu anaérobie. Des expériences effectuées avec des mutants *nrdD⁻* ou *nrdG⁻* ont révélé que les deux gènes sont nécessaires à la croissance d'*E. coli* en anaérobiose (Garriga 1996). Ils sont apparemment co-transcrits à partir d'un promoteur commun situé en amont du gène *NrdD*. Cependant le taux d'expression du gène *NrdD* est bien plus élevé que celui du gène *NrdG* (Siedow 1999).

B.II.2.b - L'activase ou protéine β

◆ Le centre fer-soufre de l'activase

La surexpression de la protéine NrdG dans des souches BL21(DE3) d'*E. coli* a permis de récupérer des extraits protéiques rosés à partir desquels a été isolée la protéine β (Ollagnier 1996). La préparation contient un mélange de formes monomérique (contenant 0,01 à 0,02 fer par protéine β) et dimérique (0,1 à 0,25 fer par protéine β) en sortie de colonne Superdex-75. Ces formes ont été démétallées (protéine apo β) par réduction au dithionite de sodium en présence d'EDTA puis reconstituées en anaérobiose par incubation prolongée avec du fer et du soufre inorganique en présence de DTT (Tamarit 1999). La protéine obtenue, de couleur marron, contient majoritairement un centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ par chaîne polypeptidique, comme l'ont révélé les méthodes d'analyse complémentaires employées. Ainsi environ quatre atomes de fer et de soufre labile par monomère sont dosés par colorimétrie et le spectre d'absorption UV-visible présente une bande de transfert de charge $\text{S} \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$ à 420 nm et un épaulement vers 330 nm ; l'analyse par spectroscopie de RPE indique la présence d'une

espèce de spin nul ou entier prépondérante et les spectres Mössbauer comportent un doublet majoritaire ($\delta = 0,43 \text{ mm.s}^{-1}$ et $\Delta E_Q = 1,04 \text{ mm.s}^{-1}$) caractéristique de $\text{Fe}^{2,5+}$ tétracoordinés à des atomes de soufre (Tamarit 1999). L'activase peut être réduite chimiquement en anaérobiose par le dithionite ou la 5-déazaflavine photoactivée (Ollagnier 1996; Tamarit 1999 ; Padovani 2001a) ; il apparaît à 10 K un signal RPE rhombique ($g = 2,03, 1,92$ et $1,86$) dont l'étude du comportement en fonction de la température et de la puissance est en accord avec l'existence d'une espèce de spin $S = 1/2$ de type $[\text{4Fe-4S}]^{1+}$. En présence de DTT le signal devient axial ($g = 2,03$ et $1,92$) et les propriétés de saturation en puissance du centre réduit sont modifiées. La réduction chimique du centre $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ n'est jamais quantitative et le taux de réduction varie entre 25 et 80%, en fonction des concentrations en protéine et en réducteur. En effet des expériences d'électrochimie de la protéine β directement adsorbée sur électrode d'or ont montré que le potentiel rédox du couple $[\text{4Fe-4S}]^{2+/1+}$ est très bas (Padovani 2002) : en absence de DTT, une vague pseudo-réversible apparaît à $E'^0 = -450 \text{ mV}$ (par rapport à l'ENH). Le potentiel rédox est déplacé vers une valeur légèrement plus négative (-500 mV) en présence de 10 équivalents de DTT.

Le centre $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ de l'activase est principalement converti (76%) en centres $[\text{2Fe-2S}]^{2+}$ après exposition à l'oxygène (Ollagnier 1999 ; Mulliez 1999). La réaction est réversible, puisque le fer et le soufre des centres $[\text{2Fe-2S}]^{2+}$ peut être remobilisé en conditions réductrices pour former des centres $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ dans la moitié des protéines. De plus, des études réalisées à l'aide de différentes méthodes spectroscopiques (UV-visible, RPE, ^1H -RMN et Mössbauer) ont révélé une sensibilité importante du centre $[\text{4Fe-4S}]^{1+}$ vis-à-vis de l'oxygène. L'exposition à l'air du centre réduit conduit principalement à un mélange de trois espèces, une forme $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ oxydée à un électron, une forme $[\text{3Fe-4S}]^0$ étonnamment stable à l'air ainsi qu'une forme $[\text{2Fe-2S}]^{2+}$ issue de la dégradation du centre $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ (Mulliez 1999). Il apparaît que malgré ce mélange d'espèces, la protéine oxydée à l'air conserve toute sa capacité à activer la réductase en anaérobiose et en présence d'un réducteur ; en effet l'incubation prolongée de cette forme oxydée avec du dithionite conduit à la régénération du centre $[\text{4Fe-4S}]^{1+}$ initial.

L'activase appartient à la superfamille Radical SAM. En effet la protéine β comporte un motif CXXXCXXC conservé, situé dans la partie C-terminale. La protéine β d'*E. coli* contient deux autres cystéines non conservées. Des études de mutagenèse dirigée des cinq cystéines ont permis de montrer que le centre fer-soufre est uniquement lié par les trois cystéines du motif conservé, et que les mutants de la triade Cys conservent la capacité à former un centre [4Fe-4S], probablement lié par deux cystéines seulement, en accord avec les données Mössbauer.

◆ Centre fer-soufre et activation de la protéine α

L'introduction du radical glycinylyle dans la protéine α ou réaction d'activation requiert l'intervention de la protéine β , d'une source d'électrons telle que le système NADPH : flavodoxine : flavodoxine réductase, de *S*-adénosylméthionine et de DTT, opérant de concert en anaérobiose. Le fait que la protéine β agit de manière catalytique, c'est-à-dire qu'une molécule de β est capable d'activer plusieurs molécules de réductase, permet de définir l'enzyme comme une activase (Tamarit 1999). L'hypothèse proposée par Fontecave *et al.* (2002) pour la formation du radical glycinylyle est présentée sur la figure B.6.

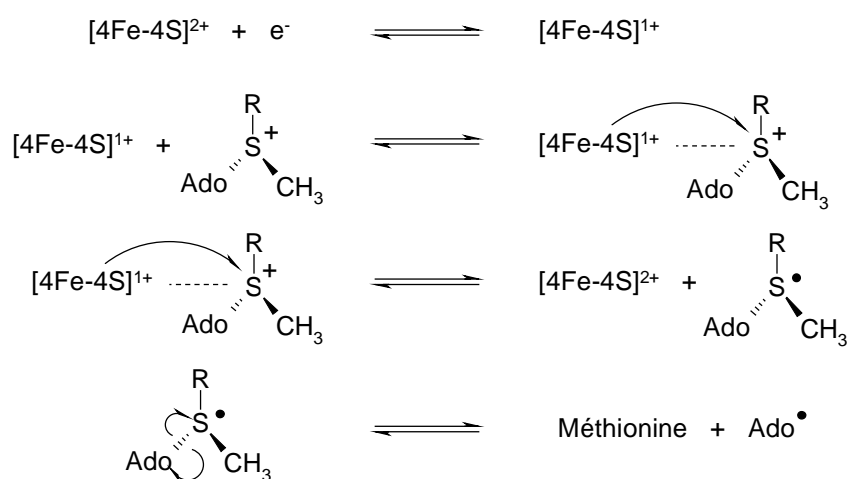


Figure B.6 - Modèle proposé pour l'activation de la RNR anaérobie d'*E. coli*. D'après Fontecave 2002.

Dans la première étape, le centre fer-soufre de la protéine β est réduit à un électron. La SAM se lie alors à la protéine β puis reçoit un électron du centre $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ adjacent. La coupure de la liaison $\text{S}-\text{C}_5'$ du radical sulfuranyle résultant conduit à la formation de méthionine et d'un radical 5'-désoxyadénosyle. Enfin le radical Ado^\bullet génère le radical glycinyle de la protéine α en arrachant un atome d'hydrogène du carbone α de la glycine 681. Plusieurs résultats étayent ce mécanisme. La formation d'un complexe intermédiaire entre la SAM et la protéine β a été suggérée par l'observation d'un effet notable de la SAM sur le signal RPE du centre réduit. Ainsi la composante à $g = 2,03$ est déplacée vers les hauts champs et la composante à haut champ s'élargit (Ollagnier 1997 ; Padovani 2001a). Des expériences de fixation sur filtre menées avec de la SAM tritiée ont montré que la liaison de la SAM à la protéine β n'est observée qu'en anaérobiose, lorsque l'enzyme est à l'état réduit, et en présence d'ions K^+ . Un K_d de $10\ \mu\text{M}$ pour le complexe β -SAM a été déterminé dans ces conditions (Ollagnier 1997). La coordination du groupe amino de la SAM à l'atome de fer différencié du centre $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ a par la suite été démontrée grâce à une étude de spectroscopie HYSCORE (Gambarelli 2005). Au cours de la réaction en « one turn-over » entre le complexe $\alpha_2\beta_2$ pré-réduit et un excès de SAM, le centre $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ est oxydé rapidement et totalement, de la méthionine et de la 5'-désoxyadénosine sont produites et le radical Gly^\bullet est généré (Ollagnier 1997 ; Padovani 2001a). Il se forme un équivalent de méthionine et 0,5 à 0,9 équivalent de radical Gly^\bullet par centre $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ initial. Aucune réaction n'a lieu en absence de réducteur lorsque le centre fer-soufre est à l'état oxydé $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$.

La flavodoxine (fldx) est une protéine à cofacteur FMN qui peut être réduite à un électron (forme semiquinone, SQ) ou à deux électrons (forme hydroquinone, HQ). La réduction du centre fer-soufre de la protéine β par l'une ou l'autre de ces formes réduites n'est pas favorable d'un point de vue thermodynamique. En effet le potentiel rédox du couple fldx/SQ, égal à $-250\ \text{mV}$, et celui du couple SQ/HQ, égal à $-440\ \text{mV}$, (par rapport à l'ENH et à pH 7,5) sont tous deux supérieurs au potentiel rédox du couple $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ (McIver 1998). De fait ni la forme SQ ni la forme HQ ne réduit de manière détectable le centre fer-

soufre de la protéine β utilisée seule. Quoi qu'il en soit l'incorporation de l'une ou l'autre des formes SQ et HQ préparées indépendamment au mélange d'activation contenant les protéines α et β conduit à la réductolyse de la SAM par la protéine β et à la formation du radical glycinyle sur la protéine α . Ce résultat s'interprète en terme de couplage entre la réaction de réduction du centre fer-soufre, thermodynamiquement non favorable, et les réactions thermodynamiquement favorables que sont la réductolyse de la SAM et surtout l'oxydation de la glycine 681 par le radical Ado \cdot . En effet la réaction globale d'activation est déplacée vers la formation du radical glycinyle du fait de la différence entre les énergies de dissociation de la liaison C—H méthylique de la 5'-désoxyadénosine (100 kcal mol $^{-1}$) et de la liaison C α —H de la glycine (79 kcal mol $^{-1}$) (Himo 1998). Cette explication est en accord avec le fait que la réductolyse de la SAM ne s'effectue pas lors de l'activation d'un mutant de la protéine α dans lequel la glycine 681 est remplacée par une alanine (Mulliez 2001). Tous ces résultats sont compatibles avec le mécanisme d'activation présenté sur la figure C.10, dans lequel le centre [4Fe-4S] $^{1+}$ de β se comporte comme un réducteur monoélectronique essentiel à la réductolyse de la SAM.

La cinétique de réductolyse de la SAM par la protéine β réduite chimiquement est très lente en absence de protéine α . L'ajout de DTT à la place de la protéine α accélère la réaction d'un facteur 50 à 100. La vitesse correspondante reste cependant très inférieure à celle mesurée en présence de la protéine α . La réductolyse de la SAM en présence de DTT conduit à la formation de *deux* équivalents de méthionine et de 5'-désoxyadénosine par centre [4Fe-4S] $^{1+}$ (Padovani 2001a).

B.II.2.c - La réductase ou protéine α

◆ Propriétés générales

La protéine α surexprimée à partir d'*E. coli* est purifiée en aérobiose en quelques étapes. La chromatographie d'affinité dATP Sepharose est une méthode très efficace basée sur les propriétés de fixation du dATP et de l'ATP de cette enzyme allostérique (Eliasson

1992). La réductase purifiée est un homodimère α_2 (2×80 kDa), ne possède pas de cofacteurs et est inactive. Il a été proposé que l'enzyme possède un pont disulfure dont la réduction est essentielle pour l'activation en protéine radicalaire. En effet l'incubation de la protéine α avec du NADPH et des quantités catalytiques de thiorédoxine et de thiorédoxine réductase s'accompagne d'une diminution de l'absorbance du NADPH à 340 nm ; la valeur du ΔDO mesuré indique que la protéine α subit une réduction à deux électrons, ce qui est compatible avec la présence initiale d'un pont disulfure. La protéine α préalablement réduite par le DTT ou par le système thiorédoxine puis purifiée est active en absence de tout réducteur (Padovani 2001b). Ainsi il a été déduit que le DTT absolument nécessaire à l'activation de la protéine α a pour fonction de réduire un pont disulfure critique non identifié.

◆ *Le radical glycinyne*

Lors de la réaction en anaérobiose avec la protéine β , la SAM, le DTT et un système réducteur de β (dithionite, déazaflavine photoréduite ou système flavodoxine), la protéine α est convertie en une enzyme active qui contient un radical organique stable caractérisé en RPE par un doublet isotrope centré à $g = 2,0033$ possédant une largeur de raies de 14 gauss et exhibant un $P_{1/2}$ d'environ 25 μW à 77 K (Mulliez 1993 ; Sun 1996). Une série d'observations a permis d'établir que le radical organique est situé sur la glycine 681 de la réductase. Ainsi les spectres RPE du radical obtenu avec des protéines α sélectivement marquées avec de la ^{13}C -glycine ou de la 2H -glycine sont significativement différents du spectre correspondant à l'enzyme sauvage (Sun 1996). En particulier la présence d'un singulet dans l'enzyme marquée avec de la 2H -glycine démontre que le doublet observé avec l'enzyme sauvage résulte du couplage hyperfin de l'électron non apparié avec l'atome d'hydrogène du $C\alpha$ de la glycine. Les spectres correspondants sont présentés sur la figure B.7. L'analyse par spectrométrie de masse du polypeptide tronqué obtenu après exposition de l'enzyme radicalisée à l'oxygène a permis de démontrer que le radical organique est situé sur la glycine 681 de la réductase (King 1995).

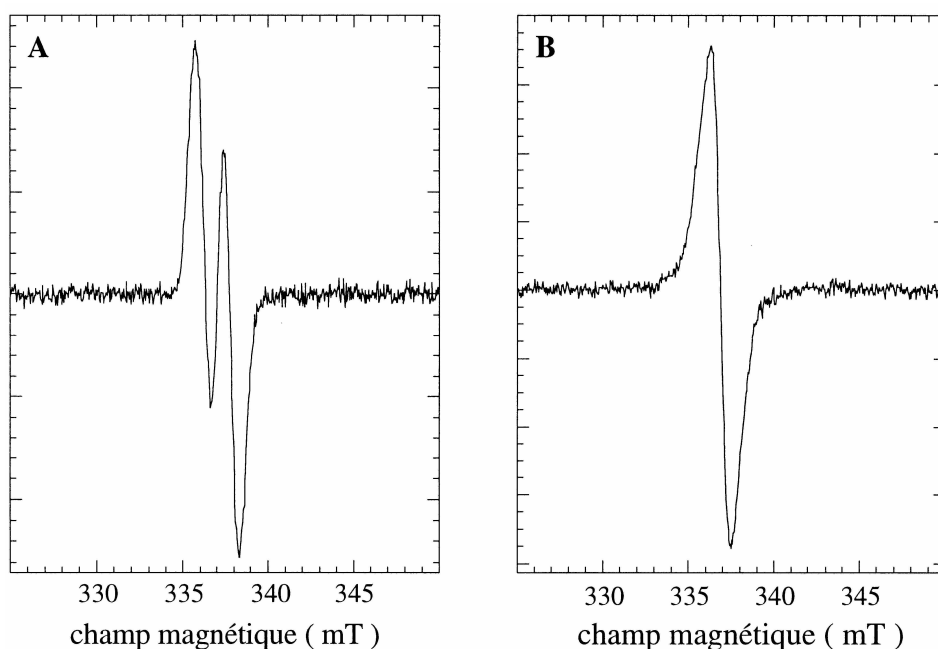


Figure B.7 - Le radical glycinyle de la RNR anaérobie d'*E. coli*. Spectres RPE bande X du radical de la RNR anaérobie (60 μ M). (A) souche sauvage, (B) protéine marquée à la ($^2\text{H},^2\text{H}$)-glycine. Conditions d'enregistrement : 21 K, 2 μ W, 1 mT, 2×10^5 .

❖ Structure de la protéine α

Les seules structures cristallographiques d'une RNR de classe III disponibles sont celles de la protéine α du bactériophage T4 (Logan 1999). La première a été obtenue à 2,75 Å de résolution à partir d'un mutant dans lequel la glycine 580, site radicalaire de l'enzyme du bactériophage T4, a été remplacée par une alanine afin d'éviter les complications dues à une éventuelle coupure ou dénaturation du polypeptide en présence d'oxygène. Bien qu'il n'ait pas été possible d'obtenir un complexe enzyme-substrat, le site de liaison du substrat a été localisé en superposant les coordonnées de la RNR de classe I (R1) complexée au GDP. L'enzyme du bactériophage T4 ne possède qu'un seul site allostérique, dit de spécificité, situé à l'interface des deux monomères constituant le dimère symétrique. Il est occupé par du dATP dans la structure, comme le montre la figure B.8.

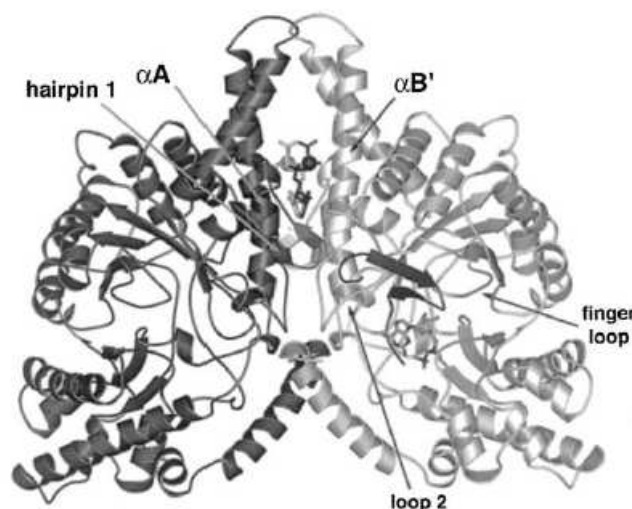


Figure B.8 - Structure du dimère de la protéine NrdD (G580A) du bactériophage T4. L'axe du dimère est orienté verticalement. La partie C-terminale du monomère A (gris clair) contenant le site radicalaire glycine muté est en noir. La cystéine 290 se situe sur la boucle désignée par le terme « finger loop ». Les deux molécules de Mg-ATP sont visibles à l'interface du dimère. La position du GDP est modélisée dans le site actif du monomère A.

La structure montre l'organisation en tonneau β/α commune à toutes les RNRs. Deux feuilletts β parallèles à cinq brins sont orientés de manière antiparallèle et connectés par une boucle étendue dirigée vers l'intérieur du tonneau entouré d'hélices α . Les acides aminés essentiels du site actif sont représentés sur la figure B.9. Celui-ci contient deux cystéines conservées : la cystéine 290 se situe à l'extrémité d'une longue boucle dirigée vers l'intérieur du tonneau (« finger loop ») et la cystéine 79 sur le brin βA . Le site radicalaire glycine (remplacée par une alanine) se trouve en position 580, à proximité de l'extrémité C-terminale. La structure obtenue comporte en réalité les résidus 27 à 542 et 571 à 586 sur un total de 605 acides aminés. La région intermédiaire reliant le site radicalaire au reste de la structure est désordonnée et donc invisible. Les résidus 571-586 forment une boucle dirigée vers le tonneau central. L'extrémité de cette boucle portant le site radicalaire muté se situe à proximité de l'extrémité de la longue boucle du site actif. Cet arrangement place le $C\alpha$ de l'alanine 580 à 5,2 Å du $S\gamma$ de la cystéine 290, ce qui suggère que le radical thiyle est formé suite à l'arrachement direct de l'atome d'hydrogène par le radical glycinyle. L'hypothèse

selon laquelle la cystéine 290 forme le radical thiyle nécessaire à l'activation du substrat est étayée par des expériences de mutagenèse dirigée et de radiomarquage photoinduit (Andersson 2000 ; Olcott 1998).

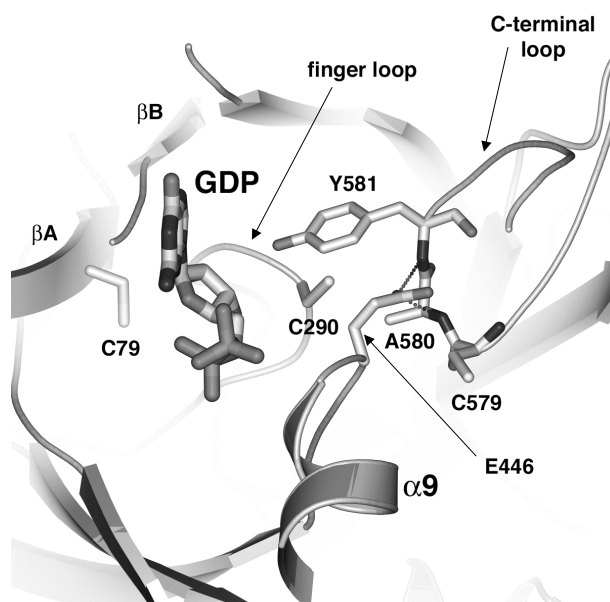


Figure B.9 - Le site actif de la protéine NrdD (G580A) du bactériophage

T4. Au centre de la figure se trouve le GDP modélisé à partir des coordonnées de la protéine R1 d'*E. coli*. Les chaînes latérales de tous les acides aminés conservés proches du site de liaison du substrat ainsi que celles de certains autres résidus importants sont représentées. En particulier les 2 cystéines catalytiques C79 et C290 ainsi que l'alanine 580 remplaçant la glycine native sont visibles. La distance entre le Cα de l'alanine 580 et le Sγ de la cystéine 290 est de 5,2 Å.

La conformation autour de l'alanine 580 est en partie déterminée par les deux liaisons hydrogènes entre la chaîne latérale du glutamate 446 et les atomes d'azote amidiques des résidus 580 et 581. Le glutamate 446 est un acide aminé conservé situé à l'extrémité N-terminale de l'hélice αH, qui dans la protéine R1 établit des liaisons hydrogènes avec le phosphate α du GDP substrat (Eriksson 1997). Selon les auteurs le glutamate 446 pourrait assurer le positionnement précis du radical Gly[•] par rapport à la cystéine 290 et donc déclencher la formation du radical thiyle en réponse à la fixation du substrat. L'asparagine

311 est assez conservée ; il a été montré que ce résidu est important pour l'activité enzymatique et pourrait participer au positionnement du formiate (Andersson 2001).

Une nouvelle structure cristallographique d'un mutant G580A de la RNR anaérobie du bactériophage T4 a récemment été obtenue à 2,45 Å de résolution (Logan 2003). Elle révèle l'organisation de la partie C-terminale comportant les acides aminés 542 à 571, invisible dans la précédente structure. Les quatre cystéines C543, C546, C561 et C564, appartenant à deux motifs CXXC conservés, construisent un site métallique tétraédrique qui forme une protubérance individualisée, représentée sur la figure B.10.

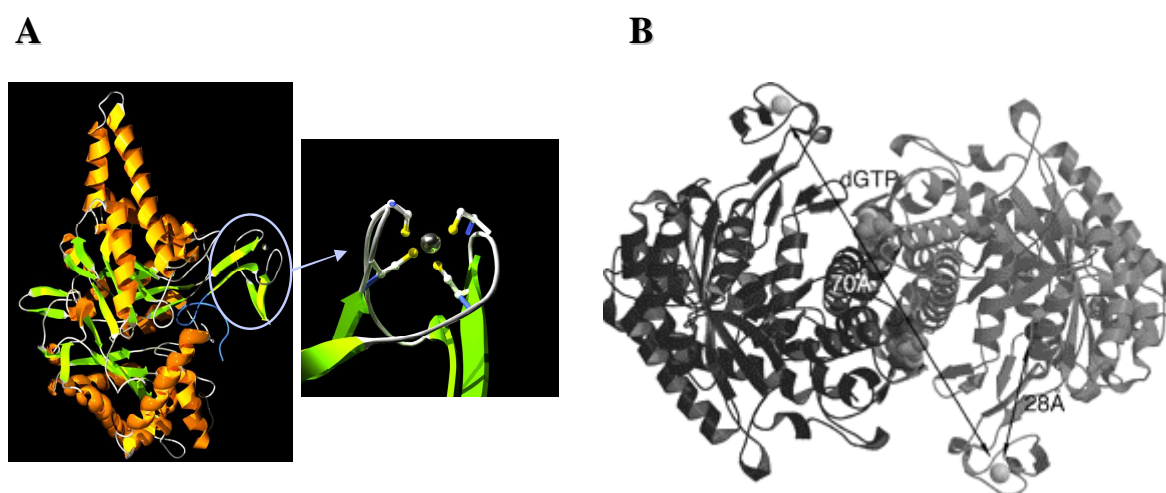


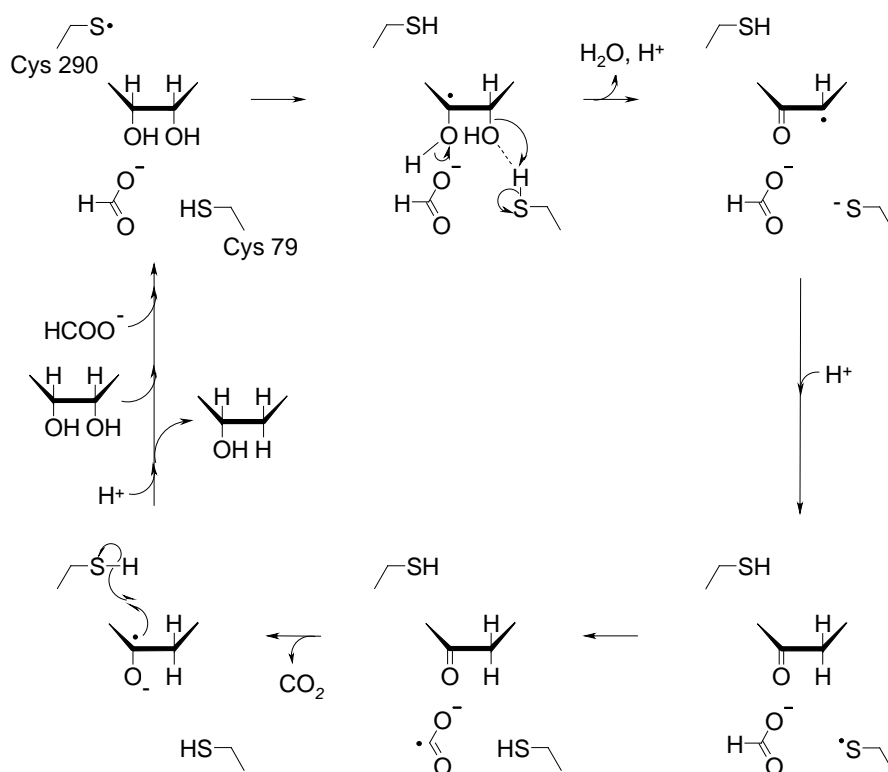
Figure B.10 - Localisation du site métallique $M(Cys)_4$ de la protéine NrdD (G580A) du bactériophage T4. A, structure du monomère de la protéine G580A et agrandissement du site métallique tétraédrique ; la boucle C-terminale portant le site glycine radicalaire muté est en bleu. B, position des sites métalliques dans le dimère ; les distances entre le site $M(Cys)_4$ et le site radicalaire muté du même monomère d'une part, et entre les deux sites métalliques d'autre part sont indiquées.

Les motifs CXXC se situent sur des boucles et la région qui les connecte est une courte épingle à cheveux à deux brins β . Le site métallique est relié par un bras flexible à la partie N-terminale constituant la majeure partie de l'enzyme et à la boucle C-terminale qui contient l'alanine 580 substituant la glycine essentielle dirigée vers l'intérieur du tonneau central. Comme le montre la figure B.10 (B), la distance entre l'atome métallique et le $C\alpha$ de l'alanine 580 est de 25 Å ; les atomes métalliques des deux monomères sont quant à eux

distants de 70 Å. L'étude des cristaux par fluorescence X a permis de montrer que le site M(Cys)₄ contient majoritairement du zinc, ainsi que des traces de fer. L'homologie structurale entre ce site et les domaines métalliques de rubrérythrine ou d'autres protéines apparentées indique clairement que le site M(Cys)₄ de la RNR anaérobie n'est pas artéfactuel. Le remplacement de chacune des cystéines du site métallique de l'enzyme du bactériophage T4 par une sérine conduit à une incapacité des mutants à générer le radical Gly[•] (Andersson 2000). De même les mutants Cys→Ala de la RNR d'*E. coli* ne forment pas le radical Gly[•] et ont une activité CTP réductase négligeable par rapport à celle de l'enzyme sauvage. De plus les activités SAM réductase de la protéine β mesurées lors de la réaction d'activation de chacun des quatre mutants sont très réduites (3 à 10%) en comparaison de l'activité correspondante mesurée en présence de l'enzyme sauvage (Logan 2003). Ces résultats révèlent ainsi l'importance du site métallique pour l'activation de la RNR anaérobie.

◆ Mécanisme enzymatique

Le mécanisme de réduction des ribonucléotides par les RNRs de classe III n'est pas connu précisément. Cependant il est très probable que la réaction s'effectue selon un mécanisme radicalaire analogue à celui des RNRs de classe I et II qui a été élucidé par J. Stubbe notamment (Stubbe 1998a). Ainsi des nucléotides modifiés portant un groupe azido, chloro ou fluoro en position 2' inhibent aussi bien les RNRs de classe III que les RNRs de classes I et II (Eliasson 1994). Fontecave *et al.* ont proposé un mécanisme similaire à celui de Stubbe dans lequel la réaction est initiée par l'arrachement de l'hydrogène 3' du substrat par le radical thyle de la cystéine 290 (enzyme du bactériophage T4), pour donner un radical substrat facilitant l'hétérolyse de la liaison C—OH en 2' (Fontecave 2002). Lorsque la réaction est menée dans du tampon deutéré, une petite quantité de deutérium (1 à 2%) est incorporée en position 3' du dNTP produit (Eliasson 1995). Cette observation étaye l'hypothèse selon laquelle l'hydrogène en 3' arraché est réintroduit en position identique à la fin du cycle et que le site radicalaire de la protéine qui arrache l'hydrogène est échangeable avec le solvant. Il ne s'agit donc pas du radical Gly[•], puisque aucun échange entre l'eau et ce dernier n'a pu être observé, mais plutôt d'un radical thyle. Alors que les RNRs de classes I et



Après arrachement de l'atome d'hydrogène en 3' du ribose par le radical thiyle de la cystéine 290 (1), le groupement OH en 2' est protoné par la seconde cystéine du site actif

(C79). La perte d'une molécule d'eau sur cette position et la déprotonation de l'hydroxyle en 3' conduisent à l'intermédiaire radicalaire 3'-céto (2). Une réduction à un électron de cet intermédiaire par la cystéine 79 anionique conduit au 3'-cétonucléotide et à un radical thiyle (3) qui arrache l'atome d'hydrogène du formiate. Le radical formyle CO_2^\bullet résultant (4) est un excellent agent réducteur capable de réduire les cétones en radicaux cétyles. Le radical 3'-cétyle (5) conduit finalement au désoxyribonucléotide par arrachement de l'atome d'hydrogène du résidu C290 et protonation de l'oxygène en 3'. Dans cette hypothèse, le formiate constitue une source de radicaux formyles. Une étude récente, basée sur des calculs de mécanique quantique, propose deux rôles pour le formiate (Cho 2001). D'une part, il assisterait la déprotonation du groupe 3'-OH, facilitant ainsi la perte de la molécule d'eau en position 2'. Dans les RNRs de classe I, ce rôle est accompli par le glutamate 441 (*E. coli*). D'autre part, il serait oxydé par le radical thiyle 79 pour former le puissant réducteur CO_2^\bullet .

B.II.2.d - Le complexe $\alpha_2\beta_2$

Un complexe entre les protéines α et β peut être isolé par chromatographie d'affinité d'ATP Sepharose : cette méthode est classiquement employée pour purifier la réductase, mais la protéine β est également retenue du fait de sa forte interaction avec la protéine α . Des expériences de sédimentation sur gradient de sucrose réalisées avec de telles préparations ont montré que la protéine α (non activée) forme un complexe 1:1 avec la protéine β , que cette dernière contienne un centre fer-soufre ou non. Puisque la protéine α est homodimérique, la réductase et l'activase forment un complexe $\alpha_2\beta_2$ dans les conditions expérimentales utilisées. Les solutions de protéine β sont constituées d'un mélange de monomères, dimères et polymères en équilibre. La liaison de la réductase homodimérique déplace donc l'équilibre vers la formation du dimère. Les propriétés du centre fer-soufre au sein du complexe $\alpha_2\beta_2$ sont assez similaires à celles du centre de la protéine β seule. Cependant le potentiel rédox du centre dans le complexe en absence et en présence de DTT est respectivement égal à -530 mV et -550 mV (Padovani 2002). Aucune structure tridimensionnelle d'un complexe entre les protéines α et β n'est actuellement disponible ; les caractéristiques moléculaires de

l'interface entre les deux protéines ne sont donc pas connues. L'activation de la protéine α implique un transfert de radical inter-protéique. Le site radicalaire Gly est relativement proche de la surface de la protéine ; toutefois la structure cristallographique de la protéine α montre que le groupe méthyle de l'alanine 580, correspondant à l'atome d'hydrogène de la glycine radicalisable de l'enzyme native, est dirigé vers l'intérieur de la protéine et est inaccessible au solvant (Logan 1999). Il est ainsi très probable que la formation du radical Gly \bullet est dépendante d'un réarrangement conformationnel de la (des) protéine(s). En particulier l'affinité élevée de la réductase non activée pour l'activase est apparemment incompatible avec le fait que la protéine β agit de manière catalytique lors de la réaction d'activation. Si l'association étroite de la réductase à l'activase est favorable à la mise en place d'un environnement adapté au transfert de radical entre les deux protéines, la dissociation du complexe est nécessaire pour que la protéine β puisse activer d'autres molécules de protéine α . Les interactions moléculaires transitoirement modifiées suite à la formation du radical Gly \bullet ne sont pas identifiées. Le complexe entre l'activase et la réductase est apparemment beaucoup moins stable dans le cas de la RNR de classe III de *L. lactis* (Torrents 2001).

B.II.2.e - Le test d'activité RNR

La réduction des NTPs par le formiate est catalysée par la forme radicalaire de l'enzyme uniquement. En effet la mutation de la glycine 681 en alanine conduit à une incapacité de la protéine α à former le radical organique ainsi qu'à une absence totale d'activité enzymatique. Le radical glycinyle est extrêmement sensible à l'oxygène et l'exposition de la protéine à l'air provoque la coupure de la chaîne polypeptidique au niveau de la glycine 681 et l'inactivation irréversible de l'enzyme (King 1995). Si la purification de la protéine α est réalisée en conditions d'anaérobiose stricte, il est possible d'isoler une enzyme contenant une quantité détectable de radical Gly \bullet sans que l'étape d'activation *in vitro* ne soit nécessaire. Il a donc pu être montré que la réduction du CTP substrat ne dépend que de la présence de Mg-ATP et de formiate, tous les autres composants intervenant dans l'étape d'activation de l'enzyme. Le test d'activité RNR est donc effectué en deux étapes. Dans un

premier temps la protéine α est activée en anaérobiose en présence de la protéine β , de SAM, DTT, NADPH, flavodoxine réductase, flavodoxine et K^+ . Le dithionite ou la 5-déazaflavine photoréduite peuvent se substituer au système flavodoxine (Bianchi 1995 ; Ollagnier 1997). Une solution désoxygénée contenant le substrat radioactif 3H -CTP, du formiate, de l'ATP et du Mg^{2+} est ajoutée au mélange d'activation et la production de dCTP est déterminée après un temps donné. La quantité maximale de radical Gly \bullet incorporé lors de la première étape correspond à *un* équivalent par homodimère (Padovani 2001a). Cette observation pourrait résulter d'une propriété intrinsèque de la réaction de radicalisation ; elle pourrait alternativement refléter un défaut d'efficacité de la réaction lié aux conditions *in vitro* utilisées.

DEFINITION DU PROJET

◆ Le site métallique de la protéine α (chapitre I)

L'incapacité des mutants Cys \rightarrow Ala du site M(Cys) $_4$ de la protéine α d'*E. coli* à générer le radical glycinyle essentiel a suggéré l'importance de ce site pour l'activité RNR. Dans la première partie de ce travail nous avons cherché à identifier le métal lié à la protéine α d'*E. coli* puis à comprendre de quelle manière le site M(Cys) $_4$ participe à la formation du radical Gly \bullet de la protéine α . Pour cela la caractérisation structurale et fonctionnelle de la protéine α sauvage et des mutants Cys \rightarrow Ala du site métallique a été entreprise. L'importance du zinc pour l'intégrité structurale des polypeptides a été mise en évidence et la modification des conditions de préparation de la protéine α a permis d'obtenir des préparations possédant une activité RNR élevée. Les résultats obtenus sont en accord avec un rôle structural du site Zn(Cys) $_4$ de la protéine α d'*E. coli*.

◆ Activation de la protéine α (chapitre II)

Les études précédentes ont montré que le DTT est nécessaire à l'activation de la protéine α et que l'activité thiorédoxine réductase de la protéine est compatible avec la présence d'un pont disulfure. Dans le deuxième chapitre nous avons dans un premier temps cherché à localiser ce pont disulfure par mutagénèse dirigée puis montré que l'activité thiorédoxine réductase de la protéine α est en fait liée à la réduction de formes oxydées de protéines α déficientes en zinc. Toutefois l'obtention d'une activité RNR élevée avec les préparations correctement métallées nécessite toujours la présence de DTT. Afin de préciser le rôle du DTT la réaction d'activation a alors été réexaminée en détail. Nous avons montré en utilisant des méthodes biochimiques et de spectroscopie RPE que le dithiol n'est pas indispensable à la formation du radical glycinyle mais favorise l'augmentation du taux d'incorporation de Gly \cdot dans la protéine α . Enfin une corrélation entre la quantité de zinc et la quantité de radical glycinyle a pu être établie en absence de DTT. Ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes sur les stratégies mises en œuvre par l'enzyme pour contrôler la réactivité des espèces radicalaires impliquées dans la réaction.

Matériels
et
Méthodes

A - Matériel biologique

A.I - Souches bactériennes

A.I.1 - *E. coli* DH5 α

Les bactéries DH5 α ont le génotype *supE44 Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*. Cette souche à taux de transformation élevé est très utilisée pour les transformations ne nécessitant pas de spécificités particulières et les transformations effectuées en vue de purifier de l'ADN plasmidique.

A.I.2 - *E. coli* JM109(DE3)

Cette souche a le génotype *rescA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ (lac proAB) F'[traD36 proAB⁺ lac Iqlac Z Δ M15]*. Elle possède, intégrée dans son génome, une copie du bactériophage DE3 dérivé du phage λ , comprenant la région immunitaire du phage 21 et une copie du gène codant pour l'ARN polymérase du bactériophage T7. Ce gène sous contrôle du promoteur fort lacUV5 est inductible par un β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). Ce système permet l'expression des gènes clonés sous contrôle de promoteurs du phage T7, dans ce travail le gène de la réductase (*nrdD*) et de ses diverses formes mutées.

A.I.3 - *E. coli* BL21(DE3)

Cette souche a le génotype *F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm λ (DE3)*. Elle est également utilisée pour la surexpression de protéines dont le gène a été inséré dans un vecteur de surexpression sous le contrôle du promoteur T7. Ici les bactéries BL21(DE3) ont servi à surexprimer l'activase codée par le gène *nrdG*.

A.II - Plasmides

A.II.1 - pRSS

Ce plasmide porte un fragment de 4 kb issu du plasmide pSS17. Ce fragment est composé du gène de la réductase *nrdD* (2136 pdb) ainsi que de 1575 pdb en amont du gène. A 236 pdb en amont du codon initiateur de la transcription (ATG) se trouve un site de fixation de la protéine FNR qui contrôle l'expression du gène *nrdD*. Ce plasmide est utilisé pour transformer les bactéries JM109(DE3) afin de surexprimer la réductase en anaérobiose.

A.II.2 - pRSSC644A, pRSSC647A, pRSSC662A et pRSSC665A

Ces plasmides sont obtenus par mutagénèse dirigée à partir du plasmide pRSS et sont utilisés pour transformer les bactéries JM109(DE3). Ils permettent de surexprimer en anaérobiose les 4 mutants issus du remplacement de chacune des 4 cystéines formant le site métallique de la réductase par une alanine.

A.II.3 - pRSSG681A

Ce plasmide (don de X. Sun, Stockholm, Suède) permet l'expression en anaérobiose d'un mutant de la protéine α possédant une alanine à la place de la glycine 681 (site radicalaire de l'enzyme sauvage).

A.II.4 - pT7 α

Ce plasmide résulte de l'insertion du gène de la réductase *nrdD*, préalablement amplifié par PCR à partir du plasmide pRSS, aux sites de restriction NdeI et HindIII du plasmide pT7-7. Ce plasmide transformant les bactéries JM109(DE3) permet de surexprimer la réductase en aérobie.

A.II.5 - pT7 α C550A

Ce plasmide obtenu par mutagénèse dirigée à partir du plasmide pT7 α permet de surexprimer en aérobie un mutant de la réductase dans lequel la cystéine 550 a été remplacée par une alanine (α C550A).

A.II.6 - pT7 α C680A

Ce plasmide obtenu par mutagénèse dirigée à partir du plasmide pT7 α permet de surexprimer en aérobiose un mutant de la réductase dans lequel la cystéine 680 a été remplacée par une alanine (α C680A).

A.II.7 - pN9

Ce plasmide contient le gène de l'activase *nrdG* (462 pdb) cloné dans le vecteur pET3b aux sites de restriction [SphI-BamHI]. Il sert à transformer les bactéries BL21(DE3), permettant d'obtenir l'activase en aérobiose.

A.III - Milieux de culture

La composition des milieux de culture a été décrite précédemment (Samibrook 1989). Les milieux utilisés sont les milieux complets LB (Luria Bertani), TB (Terrific Broth) ainsi que le milieu minimum M9. Le milieu LB contient 10 g/L de peptone tryptique de caséine, 5 g/L d'extrait de levure et 10g/L de NaCl. Le milieu LB agar contient en plus 12 g /L d'agar. Le milieu M9 contient 6 g/L de Na₂PO₄, 3 g/L de KHPO₄, 1 g/L de NH₄Cl et 0,5 g /L de NaCl. Le pH final des milieux est égal à 7.

A.IV - Surexpression des protéines

A.IV.1 - Surexpression des réductases

Différentes réductases (sauvage, mutées ou marquées) ont été employées au cours de ce travail ; ces protéines ont été surexprimées soit en anaérobiose, soit en aérobiose en fonction du type de plasmide portant les gènes correspondants (dérivé de pRSS ou de pT7-7).

A.IV.1.a - Surexpression en anaérobiose

La réductase sauvage (α) ainsi que les réductases mutées α G681A, α C644A,

α C647A, α C662A et α C665A sont obtenues en anaérobiose. 5 mL de milieu LB complétement en ampicilline (200 μ g/mL) sontensemencés avec une colonie de la souche JM109(DE3) transformée par le plasmide d'intérêt (pRSS, pRSSG681A, pRSSC644A, pRSSC647A, pRSSC662A ou pRSSC665A) puis incubés à 37°C en aérobiose sous agitation. Cette préculture permet d'inoculer à 0,075% des milieux de culture LB complétement en ampicilline (200 μ g/mL), glucose (0,2%) et éventuellement en ZnCl_2 (30 à 40 μ M). La croissance est effectuée en anaérobiose (sous 95% de N_2 et 5% de CO_2) à 36°C sur la nuit. Le lendemain, l'absorbance à 600 nm est proche de 1 et la croissance est stoppée. Les cellules sont récupérées par centrifugation (4000 rpm, 30 min, 4°C). Les culots sont repris dans du tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Une nouvelle centrifugation est effectuée (6500 rpm, 15 min, 4°C) et les cellules sont stockées à -80°C.

A.IV.1.b - Surexpression en aérobiose

Certaines réductases sont surexprimées en aérobiose, soit en milieu riche LB, soit en milieu minimum M9.

◆ En milieu LB

La réductase sauvage ainsi que les réductases mutées α C550A et α C680A sont obtenues en milieu LB. 100 mL de milieu LB complétement en ampicilline (200 μ g/mL) sontensemencés avec une colonie de la souche JM109(DE3) transformée par le plasmide d'intérêt (pT7 α , pT7 α C550A ou pT7 α C680A) puis incubés à 37°C sous agitation sur la nuit. Cette préculture permet d'inoculer à 1,5% des milieux de culture LB complétement en ampicilline (200 μ g/mL) et éventuellement en zinc (ZnCl_2 , 30 à 40 μ M). La croissance est effectuée en aérobiose à 37°C sous agitation. Lorsque l'absorbance à 600 nm atteint 0,5 les cultures sont éventuellement complétementées en ZnCl_2 (30 à 40 μ M) puis induites par l'ajout d'IPTG (200 μ M). La croissance est poursuivie jusqu'à une absorbance à 600 nm voisine de 1,2 correspondant à l'amorce du plateau (environ 3 heures). Les cellules sont récupérées et stockées comme indiqué précédemment.

◆ *En milieu M9*

Le milieu M9 est utilisé pour la production de 4 types de réductases sauvages nécessaires à la réalisation d'expériences spécifiques. Deux sont marquées au deutérium au niveau du site radicalaire (α GlyD et α C680AGlyD), la troisième contient du cobalt dans son site métallique (α Co) et la dernière est dépourvue de métal dans le site (« apo α »).

α GlyD et α C680AGlyD

5 mL de milieu LB complété en ampicilline (200 μ g/mL) sontensemencés avec une colonie de la souche JM109(DE3) transformée par le plasmide pT7 α ou pT7 α C680A puis incubés à 37°C sous agitation. Cette préculture permet d'inoculer à 1% des milieux de culture M9 complétés avec de l'ampicilline (200 μ g/mL), du glucose (0,2%), du MgSO₄ (1 mM), de la vitamine B1 (0,5 μ g/mL), une solution de FeSO₄:citrate de sodium (25 μ M :75 μ M) et de la (²H,²H)-glycine (5 mM). La croissance est effectuée en aérobiose à 30°C sous agitation sur la nuit et la journée suivante. Lorsque l'absorbance à 600 nm atteint 0,5 le milieu est complété avec 30 μ M de ZnCl₂ et les cultures sont induites par l'ajout d'IPTG (200 μ M). La croissance est poursuivie jusqu'à une absorbance à 600 nm voisine de 1,2 correspondant à l'amorce du plateau (environ 3 heures). Les cellules sont récupérées et stockées comme indiqué précédemment.

α Co et « apo α »

Les cultures des protéines nommées α Co et « apo α » sont réalisées dans des erlens en plastique préalablement rincés avec de l'eau Milli-Q passée sur résine Chelex-100 (Bio-Rad). Le milieu M9 est préparé à partir de poudre commerciale et d'eau chélexée. Les solutions stocks utilisées pour la complémentation et l'induction ainsi que le tampon de récupération des bactéries sont préparés avec de l'eau chélexée. Pour la protéine α Co, le milieu est complété avec une solution de CoCl₂ (10 à 50 μ M) juste avant l'induction. Le reste du protocole est identique à celui décrit pour la protéine α GlyD.

A.IV.2 - Surexpression de l'activase

100 mL de milieu LB complétement en ampicilline (200 µg/mL) sont ensemencés avec une colonie de la souche BL21(DE3) transformée par le plasmide pN9 puis incubés à 37°C en aérobie sous agitation sur la nuit. Cette préculture permet d'inoculer à 1,5% des milieux de culture LB complétés en ampicilline (200 µg/mL) et glucose (0,2%). La croissance est effectuée à 37°C en aérobie sous agitation jusqu'à une absorbance à 600 nm voisine de 0,4. Les cultures sont alors transférées à 25°C et induites par l'ajout d'IPTG (200 µM) lorsque l'absorbance atteint 0,5. La croissance est poursuivie jusqu'à une absorbance à 600 nm voisine de 1,2 correspondant à l'amorce du plateau (environ 3 heures). Les cellules sont récupérées par centrifugation (4000 rpm, 30 min, 4°C). Les culots sont repris dans du tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Une nouvelle centrifugation est effectuée (6500 rpm, 15 min, 4°C) et les cellules sont stockées à -80°C.

B - Méthodes de biologie moléculaire

B.I - Transformation des souches d'*Escherichia coli*

B.I.1 - Préparation de cellules compétentes

Les bactéries sont cultivées dans 10 mL de milieu LB jusqu'en début de phase exponentielle de croissance (soit une absorbance à 600 nm d'environ 0,4). Après centrifugation (5000 rpm, 10 min, 4°C), les cellules sont resuspendues dans 10 mL de CaCl₂ 0,1 M et incubées 30 min dans la glace. Le traitement des cellules par du CaCl₂ provoque un afflux d'ions chlorure accompagnés de molécules d'eau dans la cellule. La déformation de la bicouche lipidique engendrée est nécessaire à la pénétration de l'ADN lors de l'étape suivante de transformation. Les cellules sont ensuite récoltées comme précédemment et resuspendues dans 2 mL de CaCl₂ 0,1 M, glycérol 10%. Les cellules rendues compétentes sont alors aliquotées, congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C.

B.I.2 - Transformation

200 μ L de cellules compétentes sont incubés dans la glace en présence de 20 à 100 ng de plasmide pendant 30 min. Le mélange est porté 2 min à 42°C. Ce choc thermique permet d'accentuer la déstabilisation de la bicouche lipidique et de stimuler la pénétration de l'ADN plasmidique dans les cellules. Après retour dans la glace (5 min), 800 μ L de LB sont ajoutés et l'ensemble est placé 1h30 à 37°C sous agitation. Les bactéries sont récupérées par centrifugation (7000 rpm, 1 min) et reprises dans 200 μ L de surnageant, puis étalées sur boîte de Pétri contenant l'antibiotique nécessaire à la sélection des transformants. Les boîtes sont placées à l'étuve à 37°C sur la nuit.

B.II - Préparation d'ADN plasmidique par lyse alcaline

De manière générale, cette opération est réalisée à partir de cultures de cellules DH5 α transformées avec le plasmide contenant l'insert désiré. Classiquement, 10 mL de milieu TB complétés en ampicilline (200 μ g/mL) sontensemencés avec une colonie et incubés sur la nuit à 37°C sous agitation. L'extraction de l'ADN plasmidique s'effectue ensuite en utilisant le kit FlexiPrep (Pharmacia Biotech). Cette méthode utilise une procédure de lyse cellulaire alcaline comportant un traitement à la RNase et une précipitation à l'isopropanol. L'ADN plasmidique est ensuite purifié grâce à une matrice de verre. Le sel chaotrope (guanidine) nécessaire à la fixation de l'ADN permet également de dénaturer et d'éliminer les protéines de l'échantillon. L'ADN plasmidique est finalement élué dans un tampon de faible force ionique (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM). La pureté de l'ADN plasmidique est analysée sur gel d'agarose et sa concentration est estimée par spectroscopie d'absorption UV-visible sachant qu'une absorbance à 260 nm de 1 correspond à une concentration de 50 μ g/mL.

B.III - Précipitation à l'éthanol

Cette opération est réalisée si la solution d'ADN plasmidique isolé est insuffisamment concentrée, ou comme étape préparative pour le séquençage du plasmide. La solution plasmidique est précipitée en présence de 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M, pH 5,2 dans 3 volumes d'éthanol pur. Après incubation pendant 30 min à -80°C , la solution est centrifugée à température ambiante (15000 rpm, 15 min). Le culot est ensuite lavé avec 700 μL d'éthanol 70%. Après une nouvelle centrifugation à température ambiante le culot est séché puis repris dans 50-100 μL d'eau distillée stérile.

B.IV - Digestion

En général, 0,2 à 3 μg d'ADN plasmidique sont digérés par 5U d'enzyme de restriction dans un tampon de réaction approprié spécifié par le fabricant et dans un volume réactionnel final compris entre 10 et 50 μL . La réaction s'effectue à 37°C pendant 1 à 3 h en fonction de l'enzyme utilisée.

B.V - Electrophorèse sur gel d'agarose

Les fragments d'ADN plasmidique issus d'une digestion ou d'une réaction de PCR sont analysés sur un gel d'agarose à 1 ou 2%, en fonction de la taille des fragments à analyser. Un volume de tampon de charge (bleu de bromophénol 0,25%, xylène cyanol 0,25%, glycérol 30%) est ajouté à 5 volumes de la solution d'ADN puis le mélange est déposé sur le gel d'agarose, de même que des marqueurs de taille standard (issus de la digestion du phage λ par HindIII). Après migration sous une tension de 70 V dans du tampon TAE (Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM), le gel est immergé dans une solution de TAE contenant environ 5 $\mu\text{g/mL}$ de bromure d'éthidium (BET). La fluorescence du BET intercalé entre les bases de l'ADN est ensuite observée sous lumière UV.

B.VI - Mutagenèse dirigée

Les mutants α C550A et α C680A sont obtenus par mutagenèse dirigée grâce au kit QuikChange (Stratagene). Cette méthode nécessite l'utilisation d'un plasmide double brin (ici le plasmide pT7 α) portant le gène d'intérêt (*nrdD*) ainsi que 2 oligonucléotides synthétiques contenant la mutation désirée et complémentaires aux brins du plasmide (Invitrogen). Les séquences des oligonucléotides utilisés sont présentées dans le tableau B.1.

nom	séquence des amorces ^(a)	conditions ^(b)
α C550A1	5' g agt gaa aac ctg gcc gat cgc ttc tgc c 3'	30 s à 95°C / 60 s à 55°C / 600 s à 68°C
α C550A2	5' g gca gaa gcg atc ggc cag gtt ttc act c 3'	
α C680A1	5' ct cgc cgc gtg gcc gga tat tta g 3'	30 s à 95°C / 60 s à 59°C / 600 s à 68°C
α C680A2	5' c taa ata tcc ggc cac gcg gcg ag 3'	

Tableau B.1 - Séquences des amorces et conditions utilisées pour la construction des mutants α C550A et α C680A. (a) Les nucléotides modifiés à l'origine de la mutation Cys→Ala sont indiqués en gras et l'écriture respecte l'organisation en codons ; (b) les conditions s'appliquent aux 16 cycles de température précédés d'un cycle de 30 s à 95°C et suivis d'un cycle final de 600 s à 68°C.

La mutagenèse s'effectue par un enchaînement de cycles de température réalisés de manière automatique par un thermocycleur. Chaque cycle comporte 3 étapes : dans un premier temps les 2 brins de l'ADN matrice sont séparés par dénaturation thermique, puis les oligonucléotides s'apparient à leur séquence complémentaire sur l'ADN matrice. Ils servent d'amorces pour l'étape d'élongation, au cours de laquelle la *PfuTurbo* polymérase (une ADN polymérase thermorésistante) synthétise l'ADN complémentaire au brin parental. Une fois cet enchaînement de cycles terminé, le produit de la réaction est traité par la *Dpn I*, une endonucléase qui digère spécifiquement l'ADN méthylé et hémiméthylé du plasmide parental. L'ADN muté est finalement introduit dans des cellules compétentes (ici des bactéries DH5 α) qui relient les 2 extrémités du plasmide encore libres après la synthèse de

l'ADN. Le gène modifié codant pour la réductase a été entièrement séquencé (Genome Express SA) pour chacun des 2 plasmides pT7 α C550A et pT7 α C680A, confirmant l'introduction de la mutation désirée.

C - Méthodes biochimiques

C.I - Préparation d'extraits solubles

C.I.1 - Protocole standard

Les culots de bactéries collectés après la culture sont décongelés à température ambiante puis repris dans du tampon d'extraction (Tris-HCl 30 mM pH 7,5, KCl 30 mM, DTT 5 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, ZnCl₂ 50 μ M). La solution est soniquée à une température inférieure à 10°C par cycles de 10 s pendant 5 à 7 min avec une amplitude de 40% pour les réductases et de 50% pour l'activase. Les débris cellulaires sont alors éliminés par centrifugation (15500 rpm, 30 min, 4°C). Le surnageant, contenant les extraits solubles, est traité au sulfate de streptomycine (3 % p/v) solubilisé dans du tampon d'extraction pendant 30 min sous agitation à 4°C. Les acides nucléiques précipités sont alors éliminés par centrifugation (15500 rpm, 15 min, 4°C). Le culot blanc obtenu contenant l'ADN est éliminé. Le surnageant est traité pendant 60 min sous agitation à 4°C avec de la DNase pancréatique (2-3 mg de DNase I en présence de MgCl₂ 2,5 mM), puis la solution est centrifugée (15500 rpm, 20 min, 4°C). Les extraits obtenus sont ensuite précipités au sulfate d'ammonium saturé à 40% pour l'activase et à 55% pour les réductases pendant 30 min sous agitation à 4°C. Après 15 min de centrifugation à 15500 rpm et 4°C, le culot est repris dans du tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8, KCl 30 mM pour l'activase ou du tampon Tris-HCl 100 mM, pH 8, KCl 100 mM pour les réductases. La solution est dialysée contre le même tampon toute la nuit à 4°C sous agitation. Cette dernière étape de dialyse est facultative dans le cas des réductases en fonction de la méthode de purification choisie par la suite.

C.I.2 - Variantes

Quelques modifications sont apportées au précédent protocole lors de l'extraction des protéines α Co et « apo α ». Le tampon d'extraction utilisé pour la protéine α Co est chélexé et ne contient ni EDTA ni ZnCl_2 . Pour la protéine « apo α » la concentration d'EDTA est augmentée à 5 mM.

C.II - Purification des protéines

C.II.1 - Purification des réductases

Deux méthodes de purification sont employées pour purifier les différentes réductases, la chromatographie sur support hydrophobe Butyl Sepharose et la chromatographie d'affinité d'ATP Sepharose

C.II.1.a - Protocoles généraux

❖ *Chromatographie sur support hydrophobe Butyl Sepharose*

Les culots protéiques obtenus après précipitation au sulfate d'ammonium sont repris dans le minimum de tampon KPi 50 mM pH 7,9 sans étape de dialyse intermédiaire. La solution est diluée 5 à 6 fois avec du tampon KPi 50 mM pH 7,9, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,8 M puis injectée sur une colonne préparée avec de la résine Butyl Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia) et préalablement équilibrée avec du tampon KPi 50 mM pH 7,9, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,8 M à un débit de 3 mL/min. La colonne est lavée avec 3 volumes du tampon précédent puis l'élution est effectuée selon un gradient décroissant de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (de 0,8 à 0 M dans du tampon KPi 50 mM pH 7,9) avec 3 paliers à 0,6, 0,4 et 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La réductase est majoritairement éluée vers 0,4 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, au niveau du deuxième palier. Les fractions contenant la protéine d'après l'analyse par gel SDS-PAGE 12% sont rassemblées, concentrées et lavées plusieurs fois avec du tampon KPi 50 mM pH 7,9 par ultrafiltration puis sur Amicon 30K

(Millipore). A ce stade la pureté de la protéine est estimée à 85%. Certaines préparations de protéine ont été directement utilisées après cette première étape de chromatographie.

❖ *Chromatographie d'affinité dATP Sepharose*

Cette méthode permet de purifier la réductase présente dans les extraits protéiques après précipitation au sulfate d'ammonium, auquel cas la solution doit être préalablement dialysée. Elle est également utilisée comme étape de purification supplémentaire après une première purification par chromatographie sur support hydrophobe.

La résine d'affinité utilisée est préparée par couplage entre les groupements CNBr d'un gel de Sepharose activé (Pharmacia) et le 4-aminophényl- γ -désoxyadénosine triphosphate, un ligand obtenu par synthèse chimique. La solution protéique est diluée à 2 mg/mL avec du tampon Tris-HCl 100 mM pH 8, KCl 300 mM puis injectée à un débit de 0,2 mL/min sur la dATP Sepharose équilibrée avec le tampon précédent. La colonne est lavée avec 5 à 10 volumes du même tampon puis la réductase retenue sur le gel est éluée avec du tampon Tris-HCl 100 mM pH 8, KCl 300 mM, ATP 1 mM. Les fractions contenant la réductase d'après l'analyse par gel SDS-PAGE 12% sont rassemblées puis concentrées et lavées avec du tampon Tris-HCl 100 mM pH 8, KCl 100 mM sur Amicon 30K. La pureté de la protéine issue de cette chromatographie d'affinité est supérieure à 90%.

C.II.1.b - Protocoles spécifiques

Quelques modifications sont apportées aux précédents protocoles lors de la purification des protéines α Co et « apo α ». Quelle que soit la méthode employée pour purifier la protéine α Co, tous les tampons utilisés au cours de l'opération sont passés sur résine Chelex 100. La protéine « apo α » est purifiée selon la première méthode. Les tampons nécessaires sont supplémentés en EDTA (5 mM). La protéine pure est lavée avec du tampon Tris 100 mM pH 8, KCl 100 mM chélexé.

C.II.2 - Purification de l'activase

C.II.2.a - Chromatographie d'échange d'anions Q XL

Afin d'éliminer les oligonucléotides restants, les extraits obtenus après dialyse sont déposés sur une colonne échangeuse d'anions Q XL de 20 mL (HiPrep 16/10, Pharmacia) équilibrée en tampon de dialyse à un débit de 2 mL/min. Le lavage de la colonne avec 4 à 5 volumes du même tampon permet de récupérer l'activase non retenue. L'augmentation de la force ionique avec du tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8, KCl 1 M provoque l'élution des oligonucléotides fixés sur la colonne. Les fractions contenant l'activase d'après l'analyse par gel SDS-PAGE 15% sont rassemblées, concentrées et lavées avec du tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8, KCl 100 mM, EDTA 5 mM, DTT 5 mM par ultrafiltration puis sur Amicon 10K (Millipore).

C.II.2.b - Chromatographie de filtration sur gel SDX 75

La solution protéique obtenue après Q XL (volume maximum 5 mL, 100 mg par injection) est déposée sur une colonne Superdex 75 de 120 mL (HiLoad 16/60, Pharmacia) équilibrée avec du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8, KCl 100 mM, EDTA 5 mM, DTT 5 mM à un débit de 0,8 mL/min. L'élution s'effectue dans les mêmes conditions de tampon et de débit et des fractions de 2 mL sont récupérées. La forme monomérique de l'apoprotéine (β) est éluée en un pic majoritaire précédé d'un pic correspondant à la forme dimérique. Après une analyse par gel SDS-PAGE 15% les fractions correspondant à la forme monomérique sont rassemblées, concentrées et lavées extensivement avec du tampon Tris-HCl 100 mM pH 8, KCl 50 mM par ultrafiltration afin d'éliminer EDTA et DTT. La pureté de la protéine est estimée à 90% au minimum.

C.III - Reconstitution de l'activase

L'incorporation du centre fer-soufre de l'activase est réalisée en boîte à gants sous atmosphère contrôlée (moins de 2 ppm d'O₂) à 18°C. L'apoprotéine β (10 mg/mL dans du

tampon Tris-HCl 100 mM pH 8, KCl 50 mM) est incubée 30 min en présence de 5 mM de DTT. Six excès molaires par rapport à β d'une solution de sulfure de sodium (Na_2S dans H_2O) sont ajoutés en une fois puis, progressivement, 6 excès molaires d'une solution de fer(II) (sel de Mohr $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$ dans H_2O). Le mélange est incubé sur la nuit dans la boîte à gants. Le lendemain la solution est traitée par une solution d'EDTA (2,5 mM) pendant 30 min puis déposée sur une colonne Sephadex G-25 de 30 mL équilibrée à un faible débit avec du tampon Tris-HCl 100 mM pH 8, KCl 50 mM. La protéine colorée (marron-noire) débarrassée de l'excès de fer et de soufre est récupérée dans une cellule d'ultrafiltration, concentrée sur Centricon YM10 (Amicon) et lavée deux fois avec 8 mL du tampon précédent dans la boîte. En fin de manipulation, un spectre UV-visible est enregistré puis la protéine reconstituée est aliquotée avant d'être congelée à -80°C .

C.IV - Réduction de l'activase

La réduction du centre $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ de la protéine β s'effectue en boîte à gants sous atmosphère contrôlée (moins de 2 ppm d' O_2) et à 18°C .

L'activase β peut être réduite de manière chimique ou photochimique. La réaction est suivie par spectroscopie d'absorption UV-visible ; en effet la réduction s'accompagne d'une diminution d'environ 25% de la bande de transfert de charge $\text{S} \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$ du centre $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ à 420 nm.

C.IV.1 - Réduction chimique

Une solution de dithionite est préparée en anaérobiose dans du tampon Tris 100 mM pH 8, KCl 50 mM à partir de dithionite de sodium sous forme solide (poudre). La réduction de l'échantillon protéique est initiée par l'ajout de 10 excès molaires de dithionite par rapport à β en présence de DTT (5 mM). La réaction est poursuivie pendant 45 à 60 min puis le mélange est déposé sur une colonne Sephadex G-25 de 30 mL équilibrée à un faible débit

avec le même tampon. Cette étape permet d'éliminer l'excès de dithionite présent dans le mélange réactionnel ainsi que le DTT.

C.IV.2 - Réduction photochimique

La photoréduction du centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ de la protéine β reconstituée (200-800 μM) est réalisée dans une cuve en quartz de 300 μL (0,1 cm de trajet optique) en présence d'une quantité sous-stœchiométrique (20-100 μM) de 5-DAF. La réduction est initiée par irradiation de la solution pendant 30 à 45 min à l'aide d'un projecteur de diapositives disposé à 15 cm de l'échantillon. Une fois la réaction terminée, le mélange réactionnel est maintenu dans le noir à l'aide d'une feuille d'aluminium afin de stopper le flux d'électrons.

C.V - Mesure d'activités enzymatiques

C.V.1 - Activité ribonucléotide réductase

Dans un premier temps, la protéine α (1 à 5 μg par essai) est désoxygénée en présence de DTT 5 mM pendant 60 min à température ambiante dans des petits tubes en verre (longueur 2,5 cm, diamètre 0,8 cm) connectés à une rampe sous flux continu d'azote humidifié (azote GC ; 99,98%). En parallèle, les mélanges d'activation et de réduction sont désoxygénés. Au temps $t = 0$, 15 μL du mélange d'activation sont ajoutés à chacun des tubes de manière à ce que le mélange final contienne : SAM 0,4 mM, NADPH 1 mM, KCl 30 mM, Tris-HCl 30 mM pH 8, 2 μg de flavodoxine réductase, 1 μg de flavodoxine et une quantité de protéine β comprise entre 1 et 5 μg . Alternativement le mélange d'activation peut être privé de protéine β si celle-ci est ajoutée à la protéine α , dans un rapport 1:1, lors de l'étape d'incubation avec le DTT. L'incubation se poursuit pendant 60 min sous flux d'azote. Cette opération constitue l'étape d'activation de l'enzyme (obtention de la RNR sous forme radicalisée). La réaction de réduction est alors initiée en ajoutant 15 μL d'une solution dégazée contenant le substrat (^3H)-CTP 1,4 mM (50-60 dpm/pmole), ATP 1 mM, MgCl_2 10 mM, formiate de sodium 10 mM. Après 20 min de réaction les tubes sont ouverts à l'air et 500

μL de PCA 1 M sont ajoutés puis 50 μL d'une solution de dCMP à 5 mg/mL (Sigma) comme standard interne. Les tubes sont portés à 100°C pendant 10 min. L'hydrolyse acide ainsi effectuée permet d'obtenir les dérivés monophosphates des nucléotides. Après neutralisation à l'aide de 140 μL d'une solution de KOH 4 N en présence d'une goutte de rouge de phénol et élimination du précipité de KClO_4 par centrifugation (3000 rpm, 10 min), le surnageant est déposé sur une colonne Dowex AG50 WX8 d'environ 12 mL. Un lavage par une solution d'acide acétique 0,2 M (106 mL) permet d'éliminer le CMP résiduel. Le dCMP est élué avec 30 mL supplémentaires. Le rendement de chaque colonne est évalué en comparant le ΔDO (280-310 nm) de chaque fraction au ΔDO (280-310 nm) obtenu avec une solution de 30 mL d'acide acétique 0,2 M contenant 50 μL de dCMP à 5 mg/mL. La radioactivité des fractions contenant le (^3H)-dCMP est déterminée après l'addition de liquide scintillant à un aliquot (3 mL) sur un compteur à scintillation liquide Wallack 1409, ce qui permet d'accéder à l'activité spécifique de l'enzyme (AS) définie comme le nombre de nmoles de dCTP formées par min et par mg de protéine α .

C.V.2 - Activité SAM réductase

C.V.2.a - Réductolyse de la SAM

La réaction d'activation de la protéine α implique une réaction de réductolyse de la SAM par la protéine β . L'activité SAM réductase peut donc être déterminée à partir des études d'activation par la détermination des quantités de méthionine et de 5'-désoxyadénosine produites. La protéine α peut être activée de 2 manières, soit en utilisant la protéine β pré-réduite, soit de manière catalytique. Les différentes réactions d'activation sont réalisées en boîte à gants sous atmosphère contrôlée ($< 2 \text{ ppm O}_2$) à 18°C.

❖ *Activation avec β pré-réduite*

La centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ de β est réduit par le dithionite ou la 5-DAF comme indiqué précédemment. La protéine α préalablement réduite avec le système NADPH : thiorédoxine :

thiorédoxine réductase est ajoutée ($[\alpha] = [\beta] = 100$ à $200\ \mu\text{M}$). La réaction de réductolyse est initiée par l'ajout de SAM ($1,5\ \text{mM}$). A des intervalles de temps compris entre 5 et 60 min $200\ \mu\text{l}$ du mélange sont prélevés et congelés dans un tube RPE à l'intérieur de la boîte à gants.

◆ *Activation catalytique*

Dans ce cas le mélange d'activation contient : α et β en quantités équimolaires (100 à $200\ \mu\text{M}$), NADPH 2 à $3\ \text{mM}$, thiorédoxine réductase (3 à $6\ \mu\text{M}$), thiorédoxine (6 à $12\ \mu\text{M}$), flavodoxine réductase (8 à $16\ \mu\text{M}$) et flavodoxine (10 à $20\ \mu\text{M}$). La réaction de réductolyse est initiée par l'ajout de SAM ($1,5\ \text{mM}$). A des intervalles de temps compris entre 5 et 180 min $200\ \mu\text{l}$ du mélange sont prélevés et congelés dans un tube RPE dans la boîte à gants. Dans certaines expériences l'analyse par RPE n'est pas effectuée ; dans ce cas le mélange contient entre 40 et $100\ \mu\text{M}$ de protéines α et β et des quantités proportionnellement réduites des 2 systèmes enzymatiques. A des intervalles de temps compris entre 5 et 180 min $50\ \mu\text{l}$ du mélange sont prélevés et la réaction est stoppée par l'ajout de $10\ \mu\text{L}$ de TCA $1\ \text{M}$.

C.V.2.b - Analyse de méthionine

Une fois l'analyse RPE des échantillons terminée, le contenu des tubes RPE est décongelé puis précipité au TCA $1\ \text{M}$ ($20\%\ \text{v/v}$). La quantité de méthionine présente dans le surnageant après centrifugation ($15000\ \text{rpm}$, $15\ \text{min}$) est déterminée par J.P. Andrieu (LEM, IBS, Grenoble) sur un analyseur d'acides aminés System 7300 (Beckman). Les échantillons sont dérivatisés par la ninhydrine et passés sur une colonne échangeuse d'ions (citrate de sodium, $\text{pH } 2$) reliée à un analyseur dont la longueur d'onde est fixée à $570\ \text{nm}$.

C.V.2.c - Analyse de 5'-désoxyadénosine

Le contenu en 5'-désoxyadénosine des différents échantillons est déterminé par chromatographie liquide haute performance (CLHP) effectuée sur un appareil HP série 1100 équipé d'une pompe quaternaire, d'un injecteur automatique et d'un détecteur UV à barrette de

diodes. Après précipitation des protéines au TCA 1 M (20% v/v) et centrifugation le surnageant de l'échantillon à analyser (10 à 100 µL) est injecté sur une colonne CC 250/4 Nucleosil 100-5 C₁₈ (Macherey-Nagel) ou une colonne Zorbax SB-C18 (Agilent) équilibrées avec une solution de TFA (0,1%) à un débit de 1 mL/min. L'élution, suivie par la mesure de l'absorbance à 254 nm, s'effectue au même débit en 20 min avec un gradient linéaire de 0 à 28% d'acétonitrile dans du TFA 0,1%. La 5'-désoxyadénosine est éluée à 9,4 min (colonne Nucleosil) ou 10,6 min (colonne Zorbax). Une gamme étalon est établie dans les mêmes conditions avec de la 5'-désoxyadénosine commerciale (de 0,2 à 10 nmoles dans du TCA 170 mM). La droite obtenue donnant l'aire du pic d'AdoH en fonction de la quantité injectée permet de calculer la quantité d'AdoH présente dans l'échantillon. La solution obtenue est lyophilisée sur la nuit lorsque la purification par CLHP est suivie de l'analyse isotopique de la 5'-désoxyadénosine par spectrométrie de masse.

C.VI - Caractérisations biochimiques

C.VI.1 - Dosage de protéines

Les protéines sont dosées par spectroscopie d'absorption UV-visible à 595 nm selon la méthode décrite par Bradford (Bradford, 1976) grâce à une abaque établie avec l'albumine de sérum de bœuf (Sigma).

C.VI.2 - Dosage de fer

C.VI.2.a - Dosage colorimétrique

Le fer contenu dans la protéine β reconstituée est dosé par colorimétrie selon une méthode adaptée de celle de Fish (Fish, 1988) basée sur la formation d'un complexe tris[bathophénanthroline]-Fe^{II} en milieu réducteur tamponné (ascorbate de sodium + acétate d'ammonium, pH 8).

◆ *Gamme étalon*

Elle est établie à partir d'une solution de fer(II) (sel de Mohr $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$) à 1 mM dans du HCl 1 N soit 3,92 mg/mL HCl. Cette solution est diluée au 20^{ème} afin d'obtenir une solution à 50 μM .

◆ *Echantillons protéiques*

Ils sont préparés dans un volume final de 65 μL et contiennent des quantités de fer comprises dans la gamme étalon.

◆ *Protocole*

45 μL de PCA 1 M sont ajoutés à chaque tube et les solutions sont vortexées. Les tubes sont laissés 1 h à température ambiante. Après centrifugation (15000 rpm, 5 min), 90 μL de solution sont prélevés puis sont ajoutés successivement 72 μL de BPS (2,45 mg/1,44 mL H_2O), 36 μL d'ascorbate de sodium (42,9 mg/1,13 mL H_2O) et 27 μL d'acétate de sodium (solution saturée diluée au tiers). Après 30 min à température ambiante les solutions sont centrifugées (15000 rpm, 5 min). La ligne de base est effectuée sur le standard et la mesure de l'absorbance à 535-680 nm est effectuée pour chaque échantillon.

C.VI.2.b - Dosage par spectroscopie d'absorption atomique

Le fer contenu dans la protéine α est dosé par spectroscopie d'absorption atomique électrothermique à correction par effet Zeeman. L'analyse est réalisée par D. André et MC. Bouillet (DBI, CHU Grenoble) sur un spectromètre Hitachi 8270 (Tokyo, Japon). Les calibrants utilisés contiennent 0, 25, 50, 75 et 100 $\mu\text{g/L}$ de fer. La quantité déposée dans le four est de 10 μL . Les échantillons de protéine sont dilués de telle sorte que la concentration en fer se situe dans la gamme de calibration.

C.VI.3 - Dosage de zinc

Le zinc contenu dans la protéine α est dosé par spectroscopie d'absorption atomique et par colorimétrie.

C.VI.3.a - Dosage par spectroscopie d'absorption atomique

Le zinc contenu dans la protéine α est dosé par spectroscopie d'absorption atomique électrothermique à correction par effet Zeeman. L'analyse est réalisée par D. André et MC. Bouillet (DBI, CHU Grenoble) sur un spectromètre Perkin Elmer (Norwalk, Connecticut, USA). Les calibrants utilisés contiennent 0, 25, 50, 75 et 100 $\mu\text{g/L}$ de zinc. La quantité déposée dans le four est de 10 μL . Les échantillons de protéine sont dilués de telle sorte que la concentration en zinc se situe dans la gamme de calibration.

C.VI.3.b - Dosage par colorimétrie

Le zinc contenu dans la protéine α est dosé par colorimétrie selon une méthode adaptée de celle de Hunt (1985). Elle est basée sur la formation d'un complexe $\text{Zn}(\text{PAR})_2$ entre le pyridylazorésorcinol (PAR) et les ions Zn^{2+} libérés après modification des cystéines de la protéine par un réactif organomercurique, le *p*-hydroxymercuribenzoate (PMB).

◆ *Gamme étalon*

Elle est établie à partir d'une solution d'acétate de zinc ($\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) à 50 μM dans du tampon Tris-HCl 0,1 M pH 8, KCl 50 mM chélexé. Le mélange final contient entre 0 et 10 μM de zinc.

◆ *Echantillon protéique*

La protéine α est éventuellement diluée avec du tampon Tris-HCl 0,1 M pH 8, KCl 50 mM chélexé. Le mélange final contient des quantités de zinc comprises dans la gamme étalon.

◆ Protocole

Le test colorimétrique s'effectue directement dans une cuve en quartz de 100 μL et 1 cm de trajet optique préalablement rincée avec de l'EDTA (100 mM) puis du tampon Tris-HCl 0,1 M pH 8, KCl 50 mM chélexé. L'échantillon à analyser est dilué dans le tampon précédent. 5 μL de PAR sont ajoutés, puis 6 μL de PMB, de manière à atteindre un volume final de 100 μL . L'absorbance à 500 nm est mesurée après agitation manuelle de la cuve.

C.VI.4 – Détermination de l'état rédox de la réductase

L'état rédox de la réductase est déterminé en boîte à gants sous atmosphère contrôlée (moins de 2 ppm d' O_2) et à 18°C. Classiquement, une cuve en quartz de 300 μL (0,1 cm de trajet optique) contient entre 0,5 et 1,5 mM de réductase dans du tampon Tris 100 mM pH 8, KCl 50 mM. Après addition de NADPH en excès (1 à 3 mM) et de thiorédoxine réductase (0,5 à 3 μM) la cinétique d'oxydation du NADPH à 340 nm ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) est suivie pendant 5 à 10 min et poursuivie après l'ajout de thiorédoxine (5 à 15 μM) pendant 10 à 80 min jusqu'à l'obtention d'un plateau. Le ΔDO (340 nm) obtenu permet de déterminer le nombre d'équivalents réducteurs consommés et donc de calculer le nombre de ponts disulfures équivalents présents dans la réductase.

C.VI.5 - Détermination de la constante d'association du zinc à la protéine α

La constante d'association du zinc à la protéine α est déterminée d'après Jakob *et al.* (2000) à partir d'expériences de compétition entre la protéine α et le chélateur de métal TPEN ($K_a = 10^{16} \text{ M}^{-1}$). La protéine α (170 μM) est incubée dans du tampon Tris-HCl 0,1 M pH 8, KCl 50 mM chélexé avec 20 mM de DTT et des concentrations croissantes de TPEN pendant 7 h à 4°C. La protéine est ensuite purifiée deux fois par filtration sur gel sur colonne Micro Bio-Spin (Bio-Rad) équilibrée avec le tampon précédent, afin d'éliminer le DTT et le TPEN. Le contenu en zinc de la protéine est déterminé par colorimétrie comme indiqué précédemment. La constante d'association du zinc à la protéine α est calculée selon l'équation (3).

$$Ka (TPEN) = \frac{[TPEN \cdot Zn]}{[TPEN_{libre}] \times [Zn_{libre}]} \quad (1)$$

$$Ka (\alpha) = \frac{[\alpha \cdot Zn]}{[\alpha_{libre}] \times [Zn_{libre}]} \quad (2)$$

$$Ka (\alpha) = \frac{Ka (TPEN) \times [\alpha \cdot Zn] \times [TPEN_{libre}]}{[TPEN \cdot Zn] \times [\alpha_{libre}]} \quad (3)$$

Dans l'équation (3) $[\alpha \cdot Zn]$ est la concentration de protéine α complexée au zinc (obtenue par le dosage) ; $[\alpha_{libre}]$ est égale à $[\alpha_{totale}] - [\alpha \cdot Zn]$; $[TPEN_{libre}]$ est égale à $[TPEN_{total}] - [TPEN \cdot Zn]$. $[TPEN \cdot Zn]$ correspond à la concentration de protéine α non complexée au zinc ($[\alpha_{libre}]$). La concentration effective du TPEN à pH 8 est calculée d'après le pKa de la molécule, égal à 7,19 (Anderegg 1967).

C.VI.6 - Electrophorèse sur gel SDS-PAGE

C.VI.6.a - Contrôle de la surexpression

La surexpression des protéines au cours d'une culture cellulaire est contrôlée à l'aide d'un gel SDS-PAGE 12 ou 15% : des fractions de 1 mL, récoltées à différents temps de la croissance bactérienne, sont centrifugées 10 min à 15000 rpm. Le culot cellulaire, repris dans 100 μ L de bleu dénaturant (Tris-HCl 1 M, pH 6,8, SDS 10%, glycérol, BBP 2%, β -mercaptoéthanol), est porté à 100°C pendant 10 min puis centrifugé 5 min à 15000 rpm afin d'éliminer les débris membranaires et l'ADN chromosomique. Entre 10 et 15 μ L de surnageant, contenant les extraits protéiques, sont déposés sur le gel.

C.VI.6.b - Contrôle de la pureté des protéines

Au cours des différentes étapes de purification, la pureté de la protéine est estimée à l'aide d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12 ou 15% réalisée dans des conditions dénaturantes. Cette technique est couramment utilisée pour séparer les sous-unités protéiques et déterminer leur masse moléculaire apparente ($MM_{app.}$). Dans un premier temps, les protéines sont dissociées en leur forme monomérique par chauffage (5 min à 100°C) en présence de β -mercaptoéthanol et d'un détergent anionique, le dodécyl sulfate de sodium (SDS). Le β -mercaptoéthanol réduit les ponts disulfures interchaînes des protéines et le SDS, qui se lie aux polypeptides avec un taux proportionnel à leur masse moléculaire, contribue à modifier la charge intrinsèque de chaque polypeptide. Les complexes SDS-polypeptides ainsi formés (le rapport charge/masse étant identique au sein de chaque complexe) migreront dans un gel de polyacrylamide en fonction de leur $MM_{app.}$. La relation existant entre la mobilité relative (R_f) de chaque complexe et leur $MM_{app.}$ est donnée par l'équation suivante: $\log MM_{app.} = R_f$, qui dérive de l'équation de Ferguson (Ferguson, 1964). La migration est réalisée sous une tension de 150 V et une intensité de 30 mA pendant 90 min. Le gel est ensuite coloré au bleu de Coomassie (20 min) puis décoloré par une solution d'acide acétique/méthanol.

C.VI.7 - Spectrométrie de masse

C.VI.7.a - Spectrométrie de masse électrospray

Les expériences de spectrométrie de masse électrospray des protéines sont réalisées par D. Lemaire (LSMP, IBS Grenoble) sur un spectromètre de masse Q-TOF Micro (Micromass, Manchester, UK) équipé d'une source électrospray et opérant avec une tension d'aiguille de 3 kV et des tensions du cône d'extraction et du cône d'échantillonnage respectivement égales à 70 V et 2,5 V. La valeur du vide dans la première zone de pompage de l'interface de l'appareil correspond à 4,3 mbar. L'échantillon, dilué à environ 1 μ M dans une solution eau/acétonitrile (50% v/v) contenant 0,2% d'acide formique, est injecté à un débit de 5 μ L/min. Les spectres de masse sont enregistrés dans une gamme de m/z allant de

500 à 2000. L'acquisition est réalisée en mode positif. Une calibration est effectuée d'après le profil d'états multichargés obtenu lors d'une injection séparée de myoglobine de cœur de cheval dissoute dans la solution utilisée pour l'échantillon. L'acquisition des spectres et le traitement des données sont réalisés avec le logiciel MassLynx 4.0 (Waters).

L'analyse par spectrométrie de masse électrospray de la 5'-désoxyadénosine est réalisée par C. Lebrun (DRFMC/SCIB, CEA Grenoble) sur un spectromètre de masse à trappe d'ions LCQ (Thermo Electron, San Jose, USA) équipé d'une source électrospray. Les échantillons sont injectés à 2-10 $\mu\text{L min}^{-1}$ et l'analyse effectuée en mode positif. Une calibration (m/z compris entre 50 et 2000) est établie en accord avec les recommandations du fabricant. La température du capillaire est de 150-200 °C ; la tension de nébulisation est comprise entre 1 et 7 kV et la durée d'injection est de 5-200 ms.

C.VI.7.b - Spectrométrie de masse MALDI-TOF

L'intégrité structurale des différentes réductases est vérifiée par spectrométrie de masse MALDI-TOF. L'analyse est réalisée par B. Dublet (LSMP, IBS Grenoble) sur un spectromètre de masse Voyager Elite XL (Perseptive Biosystems, Framingham, MA) à temps de vol et extraction différée équipé d'une source laser à azote pulsé opérant à 337 nm. L'acquisition des spectres d'ions positifs est réalisée en utilisant un mode d'extraction linéaire avec une accélération de 25 kV, un potentiel de pré-grille de 93%, une tension du fil guide de 0,3% et un délai de temps de 250 ns. Chaque spectre représente le résultat moyenné de 100 impacts du laser. Les échantillons de protéines sont dilués dans du TFA 0,1% (concentration finale d'environ 15 μM), puis mélangés à un volume équivalent d'acide sinapinique préparé dans une solution de CH_3CN /TFA 0,3% (50% v/v) directement sur une plaque d'acier inoxydable. La plaque est séchée à l'air avant l'analyse. Une calibration externe est effectuée avec l'albumine de sérum de bœuf fournie par la société Applied Biosystems en utilisant des valeurs de m/z de 66431 (ion monochargé) et 33216 (ion dichargé). Les valeurs de m/z indiquées sur les spectres correspondent à la masse moyenne obtenue pour l'ion $[\text{M}+\text{H}]^+$.

D - Méthodes biophysiques

D.I - Spectroscopie d'absorption UV-visible

D.I.1 - Principe

Les atomes et les molécules existent dans un nombre défini de niveaux d'énergie et un changement de niveau d'énergie d'un état électronique fondamental S_0 à un état électronique excité S_1 (passage d'un électron d'une orbitale à une autre) nécessite l'absorption ou l'émission d'un quantum d'énergie ou photon. L'énergie (E) d'un photon émis ou absorbé lors d'une transition entre deux niveaux d'énergie est donné par la relation $E = h\nu$ où h est la constante de Planck et ν la fréquence du photon. Dans des molécules complexes telles que les molécules biologiques, les niveaux d'énergie sont peu espacés et les photons proches de la lumière UV et visible peuvent permettre la transition. Aussi ces molécules absorberont-elles la lumière dans le visible et l'ultraviolet.

En pratique, les spectres d'absorption UV-visible observés sont constitués de bandes d'absorption assez larges plutôt que de raies fines. Ceci s'explique par le fait qu'une transition d'un état d'énergie à un autre s'accompagne de changements simultanés entre de nombreux états vibrationnels au sein de la molécule. Ainsi, un photon possédant une énergie un peu trop faible ou un peu trop élevée pour permettre une transition électronique "pure" au sein de la molécule peut être utilisé pour une transition entre des niveaux vibrationnels associés à un état électronique trop bas et des niveaux vibrationnels d'un état électronique plus élevé : si la différence d'énergie électronique est E et la différence d'énergie vibrationnelle est e , alors les photons avec des énergies E , $E+e$, $E+2e$, $E-e$, $E-2e$,... seront absorbés.

Chaque bande d'absorption est caractérisée par la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption (λ_{\max}) et par son intensité, donnée par le coefficient d'extinction molaire ϵ_λ ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Ces deux grandeurs sont reliées à la concentration de la solution par la loi de Beer-Lambert : $A_\lambda = \epsilon_\lambda \times l \times c$, où l est la longueur du trajet optique (cm) et c la concentration (M).

D.I.2 - Application aux métalloprotéines

Pour les complexes de métaux de transition dans les protéines, il existe plusieurs types de bande d'absorption :

- les bandes de transition entre orbitales d : pour les complexes de métaux de transition, il est possible d'observer des bandes de transition de faible intensité d-d

- les bandes de transfert de charge : elles sont en général assez intenses et représentent le passage d'un électron d'un atome à un autre au cours de l'excitation. On distingue essentiellement deux catégories de bandes de transfert de charge : (i) les bandes de transfert de charge ligand→métal (un électron σ ou π du ligand est transféré au métal), de faible énergie (λ élevée) et (ii) les bandes de transfert de charge métal→ligand (transfert d'un électron métallique à une orbitale localisée sur le ligand : oxydation du métal et réduction du ligand), de forte énergie (faible λ).

En règle générale, la spectroscopie d'absorption UV-visible permet, en biologie, de caractériser un cofacteur protéique (identification et quantification) et de suivre une réaction enzymatique.

D.I.3 - Appareillage

Les spectres en aérobiose ont été réalisés avec un spectrophotomètre Hewlett Packard 8453 à barrette de diodes ou un spectrophotomètre Cary 1 bio (Varian). Les spectres en anaérobiose stricte (boîte à gants) ont été réalisés avec un spectrophotomètre Uvikon XL (Bio-Tek instruments) relié par des fibres optiques à la cuve placée à l'intérieur de la boîte.

D.II - Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE)

La spectroscopie RPE est une technique physique permettant d'étudier les espèces contenant des électrons célibataires. Dans les systèmes biologiques, ces espèces sont principalement des radicaux libres et des ions de certains métaux de transition (par exemple le fer, le cuivre, le nickel). Les composés paramagnétiques induisent l'absorption résonante

d'une radiation micro-onde lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique statique. La nature diamagnétique de la chaîne polypeptidique des métalloprotéines permet à la spectroscopie de RPE d'être une technique très adaptée à la caractérisation structurale de cofacteurs paramagnétiques dans les enzymes, dans les intermédiaires enzyme-substrat ou dans les complexes enzyme-produit. L'information obtenue par spectroscopie de RPE peut être divisée en 3 catégories : (i) une information quantitative sur le nombre de centres paramagnétiques, (ii) une information structurale sur la nature des centres paramagnétiques et (iii) une information structurale sur l'arrangement des centres paramagnétiques dans les systèmes multicentres par analyse des interactions magnétiques.

D.II.1 - Principes

Pour un système simple ne contenant qu'un seul centre de spin $S=1/2$, les deux niveaux d'énergie [α ($m_S = +1/2$) et β ($m_S = -1/2$)] sont dégénérés en absence d'un champ magnétique. L'application de ce dernier conduit à la levée de dégénérescence par effet Zeeman et les niveaux d'énergie divergent linéairement en fonction de la valeur du champ magnétique. La condition de résonance n'est réalisée que lorsque l'écart d'énergie entre les deux niveaux équivaut exactement à l'énergie des photons de la micro-onde. Expérimentalement, dans les spectromètres de RPE courants, la fréquence micro-onde est maintenue fixe (~ 9 GHz, bande X) et la condition de résonance est satisfaite en faisant varier le champ magnétique. Pour des raisons d'amélioration de la sensibilité, le spectre obtenu expérimentalement est la dérivée du signal d'absorption.

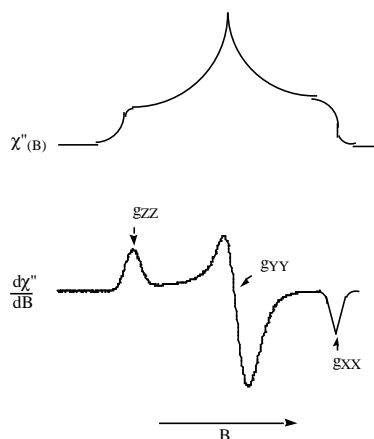


Figure D.1 - Signal d'absorption $[\chi'']$ et sa dérivée $[d\chi''/dB]$ obtenus en faisant varier le champ B . La dérivée du signal d'absorption permet de déterminer les grandeurs tensorielles (g_X , g_Y et g_Z) qui sont caractéristiques du centre paramagnétique étudié.

Le facteur g est une caractéristique de la molécule dans laquelle sont localisés les électrons célibataires. Pour les radicaux, de spin $S=1/2$, le facteur g est proche du facteur de Landé (g électronique, $g_e \sim 2,002$). L'écart entre la valeur de g du système considéré et g_e est fonction de la nature du centre paramagnétique et de son environnement moléculaire. Dans les systèmes moléculaires de basse symétrie, l'interaction Zeeman est anisotrope et le facteur g est une grandeur tensorielle. Ce tenseur possède un système d'axes principaux X , Y , Z dans lesquels il ne contient que des éléments diagonaux. En absence de tout élément de symétrie, le spectre RPE est formé de trois structures et défini par trois valeurs de g différentes g_X , g_Y et g_Z (figure D.1). Les pics observés sur le spectre RPE (g_X , g_Y , g_Z) correspondent aux points d'inflexions et à l'extremum du spectre d'absorption. Si les largeurs de raies ne sont pas petites par rapport aux écarts entre les valeurs de g , la détermination de ces valeurs nécessite une simulation spectrale.

D.II.2 - Structures hyperfines

Le premier terme de l'hamiltonien total décrivant un spectre RPE représente l'interaction avec le champ magnétique (terme Zeeman). Mais l'hamiltonien total peut

comporter d'autres termes, comme un terme de structure hyperfine, qui représente l'interaction entre le spin du centre et les spins nucléaires non nuls présents dans son environnement, soit $H = H_Z + H_{SHF}$ avec $H_{SHF} = S \cdot \tilde{A} \cdot I$, S et I étant des grandeurs vectorielles. En première approximation, la structure hyperfine conduit à l'éclatement des pics du spectre en un nombre de structures égal à la dégénérescence du spin nucléaire $I = 2I + 1$. Les différentes structures hyperfines ne pourront être observées que si A est supérieur aux largeurs des raies ; dans le cas contraire, l'interaction hyperfine est un facteur d'élargissement des raies.

D.II.3 - Largeur de raies

Divers mécanismes sont à l'origine des largeurs de raies RPE observées expérimentalement : relaxation spin-spin, couplage hyperfin avec des noyaux magnétiques de l'environnement (1H , ^{14}N), interaction dipôle-dipôle entre centres paramagnétiques.

D.II.3.a - "g-strain"

Dans le cas des métalloprotéines, les largeurs de raies RPE observées expérimentalement (~ 10 gauss) sont très supérieures à la valeur estimée à partir des contributions nommées ci-dessus (< 1 gauss). Cet élargissement est en partie dû à l'existence d'une distribution statistique des valeurs principales du tenseur g autour des valeurs moyennes, liée à l'existence d'une distribution des conformations des molécules dans la solution constituant l'échantillon. Ce processus, connu dans la littérature sous le terme de "g-strain", conduit à un élargissement du spectre RPE proportionnel à la fréquence des micro-ondes utilisées.

D.II.3.b - Effet de la température

Lorsque la température augmente, les processus de relaxation électronique spin-réseau deviennent de plus en plus efficaces, de sorte que $T_1 \sim T_2$, avec T_1 le temps de relaxation spin-réseau et T_2 le temps de relaxation spin-spin. Cette diminution s'accompagne d'un élargissement de la raie RPE proportionnel à $1/T_1$ conduisant à la disparition du signal à

plus haute température. Pour cette raison, les signaux RPE donnés par les centres métalliques paramagnétiques ne peuvent généralement être observés qu'aux températures cryogéniques et une étude de saturation en température du signal RPE observé permet de différencier certains centres métalliques paramagnétiques (les centres $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ et $[2\text{Fe-2S}]^{1+}$ par exemple).

D.II.4 - Appareillage

Les spectres RPE ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker ESP 300E à température variable équipé d'un cryostat (Oxford Instruments) qui permet d'atteindre la température de l'hélium liquide. Pour les échantillons contenant un centre fer-soufre, la concentration des spins en solution a été déterminée par double intégration des signaux comparée à celle d'un standard Cu-EDTA 200 μM . Pour le radical glycinyle, le standard est une solution de flavodoxine 175 μM (forme semiquinone) calibrée par spectrophotométrie UV-visible ($\epsilon_{350\text{nm}} = 4900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

E - Réactifs et synthèses chimiques

E.I - Réactifs

La plupart des réactifs chimiques utilisés au cours de ce travail sont commerciaux. La 5-déazaflavine a été synthétisée par P. Simon et le TPEN par E. Mulliez.

E.II - Synthèse de la résine d'affinité dATP Sepharose

La résine d'affinité dATP Sepharose permettant la purification des réductases est obtenue par couplage entre un ligand dérivé du dATP, le 2'-désoxyadénosine-5'-(γ -4-aminophényl)-triphosphate, et une résine Sepharose activée au bromure de cyanogène (Amersham Biosciences).

E.II.1 - Synthèse du dATP

Le schéma général de synthèse du ligand 2'-désoxyadénosine-5'-(γ -4-aminophényl)-triphosphate (dATP) est présenté sur la figure E.1.

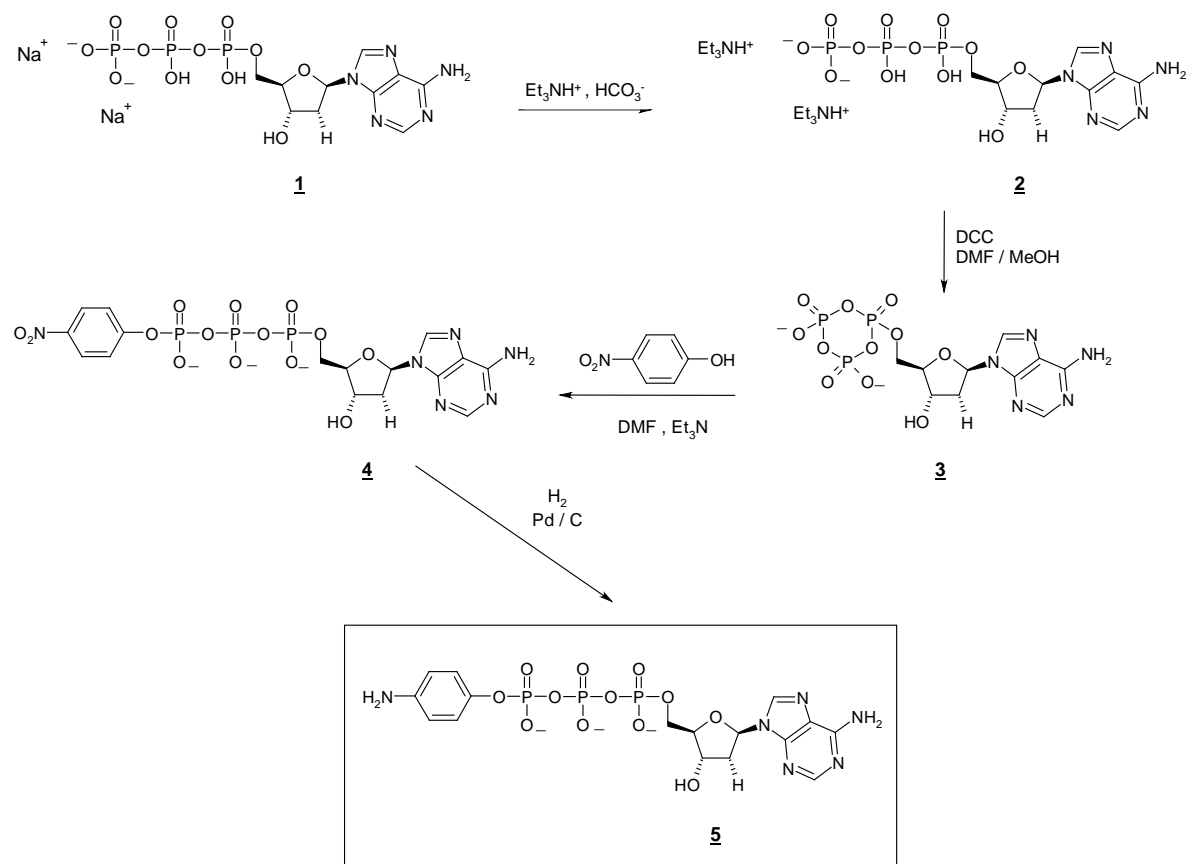


Figure E.1 - Schéma de synthèse du ligand 2'-désoxyadénosine-5'-(γ -4-aminophényl)-triphosphate (5**).**

*Conversion du sel de sodium du dATP (**1**) en sel de triéthylammonium (**2**)*

Une colonne de résine échangeuse de cation AG 50W-X8 (Bio-Rad) de 110 mL est préparée dans du tampon bicarbonate de triéthylammonium (TEAB) 1 M, pH 7,5 obtenu par barbotage de CO_2 dans la triéthylamine à froid. Elle est ensuite équilibrée avec 5 volumes de TEAB 0,1 M. 200 mg (330 μmoles) de sel de sodium du 2'-désoxyadénosine-5'-triphosphate (dATP) sont solubilisés dans 10 mL de tampon TEAB 0,1 M. La solution est chargée à 4°C

sur la colonne et des fractions de 20 mL sont immédiatement collectées. L'élution s'effectue avec du tampon TEAB 0,1 M. Les fractions qui absorbent à 260 nm sont rassemblées puis la solution est évaporée au rotavapor à température ambiante. Le résidu est séché sous vide dynamique puis conservé à -20°C sous argon.

Conversion du 2'-désoxyadénosine 5'-triphosphate (2) en désoxyadénosine-5'-trimetaphosphate (3)

Le résidu de dATP précédemment obtenu est dissous dans 2,7 mL de DMF distillé. 300 μL de méthanol sont ajoutés, puis 200 mg de dicyclohexylcarbodiimide (DCC). Le mélange est agité sous argon pendant 3 heures à température ambiante. Le solvant est évaporé puis la réaction précédente est répétée. Le solvant est à nouveau évaporé.

Synthèse et purification du 2'-désoxyadénosine-5'-(γ -4-nitrophényl)-triphosphate (4)

Le résidu est repris dans 5 mL de DMF distillé et 900 μL de triéthylamine. 900 mg de *p*-nitrophénol fraîchement sublimé dans 2 mL de DMF distillé sont ajoutés. Le mélange est agité pendant 24 h sous argon à température ambiante. Le solvant est évaporé à température ambiante.

Le résidu de l'étape précédente est dissous dans 150 mL d'eau distillée. Le pH de la solution est ajusté à 5-6 avec de l'acide acétique glacial. La solution est extraite avec 4×40 mL d'éther. La phase aqueuse est amenée à pH 7,5 avec de la soude puis l'éther résiduel est éliminé au rotavapor. Une colonne de 250 mL de résine échangeuse d'anions DEAE Sephadex A-25 est préparée dans du tampon TEAB 0,8 M puis équilibrée avec 2 L d'eau distillée. La solution contenant le dérivé de nucléotide est chargée sur la colonne après ajustement du volume à 350 mL par addition d'eau distillée. Après un lavage à l'eau (250 mL) l'élution est réalisée avec un gradient linéaire de $2,5 \times 2,5$ L de TEAB 0 à 0,8 M. Le premier litre élué est récupéré dans un erlenmeyer puis des fractions de 20 mL sont collectées. Le 2'-désoxyadénosine-5'-(γ -4-nitrophényl)-triphosphate est élué entre 0,5 et 0,7 M de

TEAB. Les fractions correspondantes, présentant un rapport DO(260) / DO(308) d'environ 2,5, sont rassemblées. La solution est concentrée à environ 40 mL et congelée à -20°C .

Synthèse du 2'-désoxyadénosine-5'-(γ -4-aminophényl)-triphosphate (5)

La solution est transférée dans un ballon tricol de 100 mL puis purgée à l'argon. 100 mg de palladium sur charbon à 10% sont ajoutés. La solution est agitée sous argon et purgée plusieurs fois avec un ballon de H_2 attaché à une aiguille plongeant dans le mélange. L'hydrogénation se poursuit pendant 3 heures, la solution étant régulièrement réalimentée en H_2 à l'aide de 2 ballons. Le mélange est alors filtré sur Célite ensuite lavée avec 2×50 mL d'eau, 4×20 mL d'un mélange éthanol / TEAB 1 M (1/1) et 50 mL d'eau. Un spectre UV-visible est réalisé pour vérifier la quasi-disparition de l'épaulement à 308 nm et l'apparition d'un léger épaulement à 235 nm. La solution est concentrée au rotavapor, diluée avec de l'eau et concentrée à nouveau. L'opération est répétée 2 fois, pour finalement obtenir un résidu sec.

E.II.2 - Synthèse de la dATP Sepharose

La réaction de couplage entre le ligand synthétisé et la résine Sepharose est illustrée sur la figure E.2. La résine Sepharose activée par CNBr est lavée extensivement avec de l'HCl 1 mM afin d'éliminer les additifs inclus dans le gel. Le ligand est dissous dans quelques mL de tampon de couplage NaHCO_3 0,1 M pH 8,3, 0,5 M NaCl. Conformément aux indications du fabricant 5 mL de solution de ligand sont préparés pour 3 mL de résine. Le volume de résine est choisi de telle sorte que 5 μmoles de ligand soient ajoutés à 1 mL de gel. Le ligand et la résine sont mélangés pendant 1 h à température ambiante puis le ligand excédentaire est éliminé par lavage de la résine récupérée sur fritté avec au moins 5 volumes de tampon de couplage. Les groupes cyano n'ayant pas réagi sont ensuite bloqués par addition de tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8. Après 2 h de réaction le gel est lavé avec du tampon acétate 0,1 M pH 4, NaCl 0,5 M (5 volumes) puis avec du tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8, 0,5 M NaCl (5 volumes). Trois cycles de lavage sont effectués de la sorte. La résine d'affinité ainsi préparée est conservée dans du tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8, 0,5 M NaCl à 4°C .

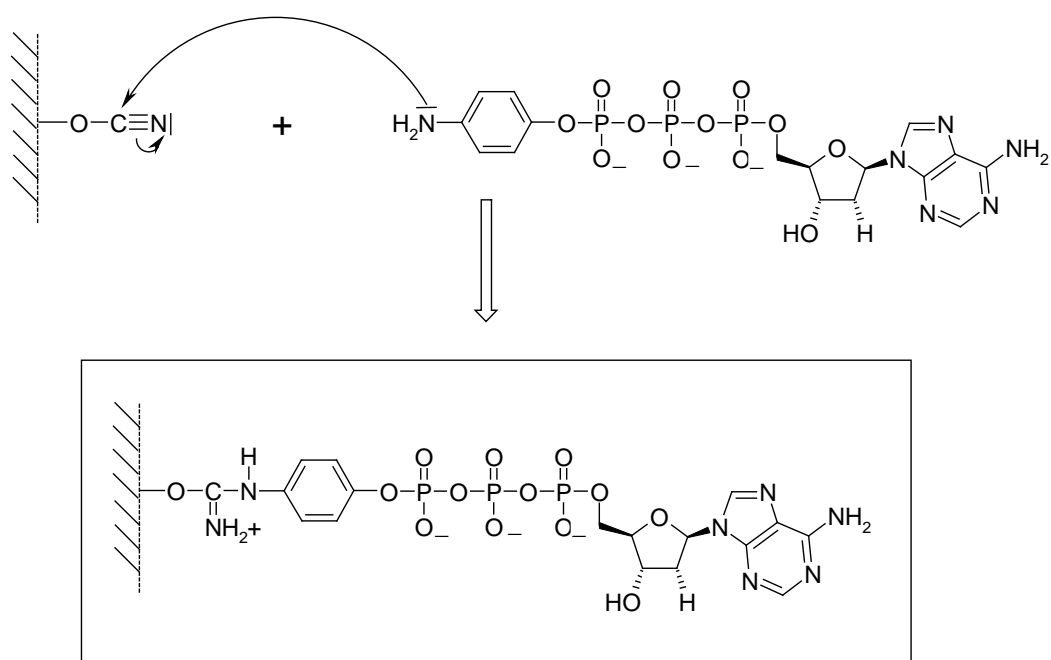


Figure E.2 - Couplage entre le 2'-désoxyadénosine-5'-(γ -4-aminophényl)-triphosphate et la résine Sepharose activée par le bromure de cyanogène.

- *Résultats* -

*Le site métallique
de la protéine α*

Bien que du zinc ait été majoritairement détecté dans les cristaux de protéine α du bactériophage T4, la nature du métal associé au site métallique dans les conditions physiologiques n'est pas connue. En effet il a été établi que le site $\text{Fe}(\text{Cys})_4$ des rubrédoxines peut être occupé par du zinc, en particulier lors de l'expression hétérologue de la protéine dans *E. coli* (Pétillot 1993). Il n'est donc pas possible de dire *a priori* si le site métallique joue un rôle structural ou rédox (Dauter 1996). Un rôle structural pour le site métallique de la protéine α peut être envisagé si ce dernier contient du zinc : le site $\text{Zn}(\text{Cys})_4$ pourrait ainsi organiser la partie C-terminale de la protéine et donc contrôler l'accessibilité et/ou la réactivité de la glycine 681. Si le métal actif est du fer, le centre $\text{Fe}(\text{Cys})_4$ pourrait être impliqué dans une réaction de transfert d'électrons. Les cystéines du site métallique pourraient également constituer des relais dans le transfert de radical entre Ado^\bullet et la glycine 681.

Dans la première partie de ce travail nous avons cherché à identifier le métal lié à la protéine α d'*E. coli* puis à comprendre de quelle manière le site métallique participe à la formation du radical glycinyle de la protéine α . Pour cela la caractérisation structurale et fonctionnelle de la protéine α sauvage et des mutants $\text{Cys} \rightarrow \text{Ala}$ du site métallique a été entreprise. L'importance du zinc pour l'intégrité structurale des polypeptides a été mise en évidence et la modification des conditions de préparation de la protéine α a permis d'obtenir des préparations possédant une activité RNR élevée. Les résultats obtenus sont en accord avec un rôle structural du site $\text{Zn}(\text{Cys})_4$ de la protéine α d'*E. coli*.

A - Identification du métal lié à la protéine α

A.I - Dosage de fer et de zinc par spectroscopie d'absorption atomique

Une analyse préliminaire de métaux a été réalisée par spectroscopie d'absorption atomique. L'étude s'est limitée à l'analyse de fer et de zinc ; en effet seuls ces deux métaux ont été mis en évidence dans les cristaux de protéine α du bactériophage T4, au sein de la

sphère de coordination tétrathiolate de l'extrémité C-terminale. Les mesures ont été effectuées sur différentes préparations de protéines α purifiées, sans traitement supplémentaire particulier. Certaines ont été obtenues au début de ce travail et d'autres ont été préparées au laboratoire antérieurement. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau A.1.

Protéine ⁽¹⁾	Zn / α ⁽²⁾	Fe / α ⁽²⁾
$\alpha^{3.5.02}$	1,4	0,026
$\alpha^{31.7.03}$	0,38	0,027
$\alpha^{2.12.03}$	0,19	0,028
$\alpha^{13.01.04}$	0,76	0,028
$\alpha^{14.01.04}$	0,82	0,022

Tableau A.1 - Dosage du fer et du zinc contenus dans diverses préparations de protéine α par spectroscopie d'absorption atomique. (1) Les préparations sont nommées selon leur date de purification finale ; (2) Les quantités sont données en équivalents d'atome métallique par monomère de protéine α .

Cette analyse montre que toutes les préparations utilisées contiennent de faibles quantités de fer, représentant moins de 3% de la quantité de protéine α engagée dans le dosage. De plus les quantités de fer dosées sont comparables de préparation à préparation. Au contraire les quantités de zinc mesurées sont significativement plus élevées, et une grande disparité entre les valeurs de Zn / α est observée ; néanmoins il apparaît que ces chiffres sont compatibles avec une occupation du site métallique de la protéine α d'*Escherichia coli* par du zinc.

A.II - Dosage de zinc par colorimétrie

Afin de poursuivre l'étude du contenu en zinc de la protéine α , une méthode de dosage de zinc réalisable au laboratoire a été recherchée puis mise au point.

A.II.1 - Principe

La méthode de dosage utilisée est une adaptation de celle de Hunt *et al.* (1985). Elle est basée sur la complexation entre le 4-(2-pyridylazo)résorcinol (PAR) et les ions Zn^{2+} . La formation du complexe coloré permettant la mesure est illustrée sur la figure A.1.

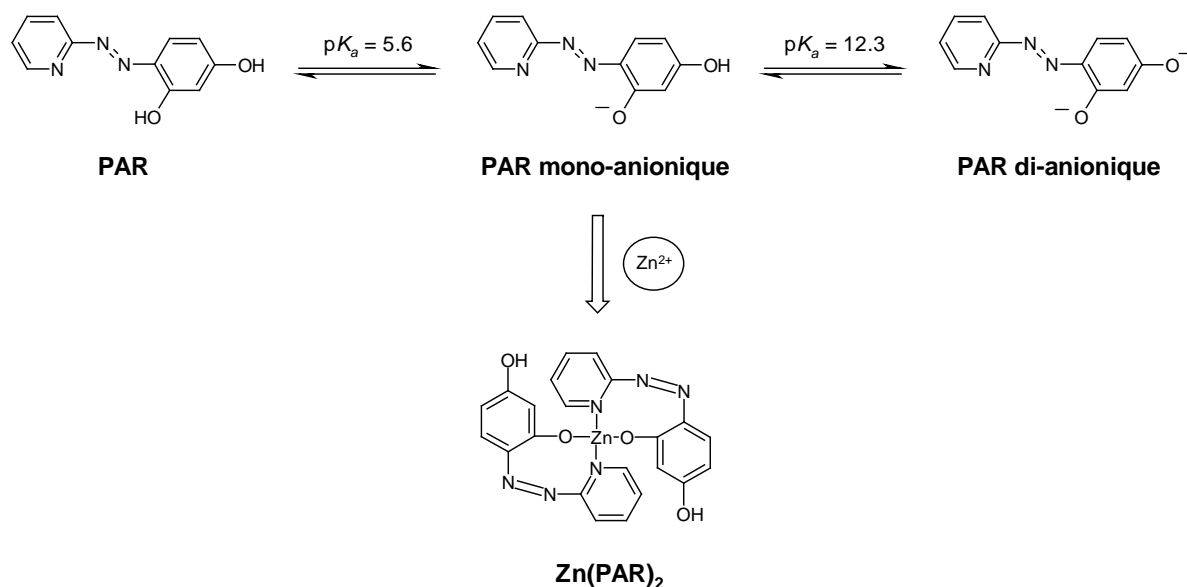


Figure A.1 - Formules chimiques du 4-(2-pyridylazo)résorcinol (PAR) et du complexe $\text{Zn}(\text{PAR})_2$.

Le zinc et le PAR peuvent former des complexes 1:1 et 1:2. Les concentrations relatives des deux complexes dépendent non seulement des concentrations totales de zinc et de PAR, mais également du pH de la solution. Il a été estimé qu'à pH 7, lorsque la concentration de PAR est de 100 μM et celle de zinc est inférieure à 12 μM , plus de 98% du zinc se trouve sous forme de complexe 1:2 $\text{Zn}(\text{PAR})_2$. Dans ces conditions la constante

d'association apparente du zinc au PAR ($K_a(\text{PAR})$) calculée est de $2 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ (Tanaka 1968). Le PAR seul absorbe fortement vers 410 nm et présente une faible absorbance résiduelle à 500 nm. La formation du complexe $\text{Zn}(\text{PAR})_2$ s'accompagne d'une augmentation importante de l'absorbance à 500 nm, ce qui se traduit visuellement par un changement de couleur de la solution qui passe du jaune à l'orangé. Le $\Delta\epsilon$ à 500 nm correspondant, calculé dans les conditions de concentrations et de pH mentionnées précédemment, est de $6,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

La réaction de complexation nécessite la libération préalable du zinc contenu dans la protéine. Cette opération est réalisée grâce à l'ajout d'un réactif organomercurique, le *p*-hydroxymercuribenzoate (PMB), à la solution de protéine. La réaction entre le PMB et la protéine est représentée sur la figure A.2.

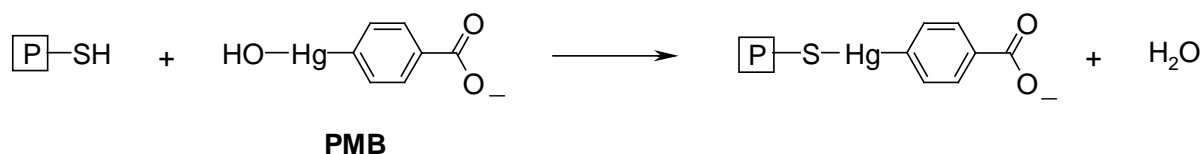


Figure A.2 - Réaction chimique entre le PMB et une fonction thiol de la protéine (P).

La réaction procède par une substitution nucléophile au cours de laquelle une fonction thiol déplace l'anion hydroxyle du PMB, pour former un dérivé mercurique de la protéine. Si les cystéines de la protéine sont impliquées dans la coordination d'un métal tel que le zinc, cette modification covalente conduit à la libération du zinc.

A.II.2 - Applications

A.II.2.a - Gamme étalon

Dans un premier temps une gamme étalon est établie avec une source de zinc

commerciale (acétate de zinc). Les spectres et la droite d'étalonnage obtenus sont représentés sur la figure A.3.

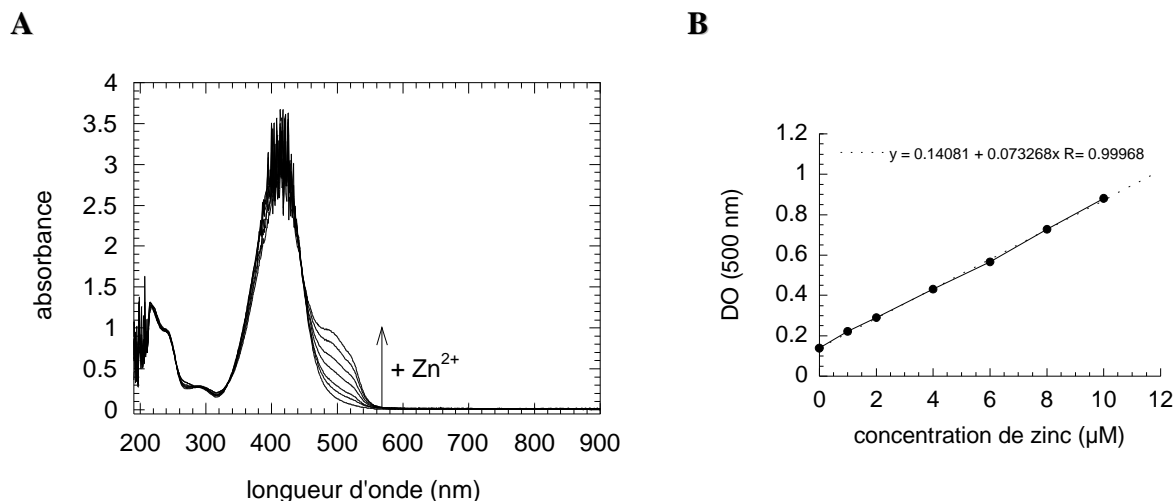


Figure A.3 - Spectres UV-visible (A) et droite d'étalonnage (B) de dosage du zinc par colorimétrie. La solution contient 100 μM de PAR, 300 μM de PMB, de 0 à 10 μM de $Zn(OAc)_2$ et du tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8, KCl 50 mM chélexé dans un volume final de 100 μL .

La figure A.3 montre que l'absorbance de la solution à 500 nm augmente linéairement en fonction de la quantité de zinc ajoutée à la solution.

A.II.2.b - Analyse d'échantillons de protéine

Un aliquot de protéine α est dilué dans la cuve de mesure de telle sorte que la concentration en zinc estimée se situe entre 0 et 10 μM . Les concentrations de PAR et de PMB sont identiques à celles de la gamme étalon. Le large excès de PMB ajouté par rapport à la protéine (au moins 30 équivalents par monomère) assure la libération totale du zinc lié par les quatre cystéines. Deux mesures ou davantage sont effectuées par échantillon. Les valeurs obtenues résultent de la moyenne d'au moins deux mesures par échantillon à analyser. La figure A.4 présente les spectres obtenus avant et après addition de PMB à la solution contenant la protéine et le PAR.

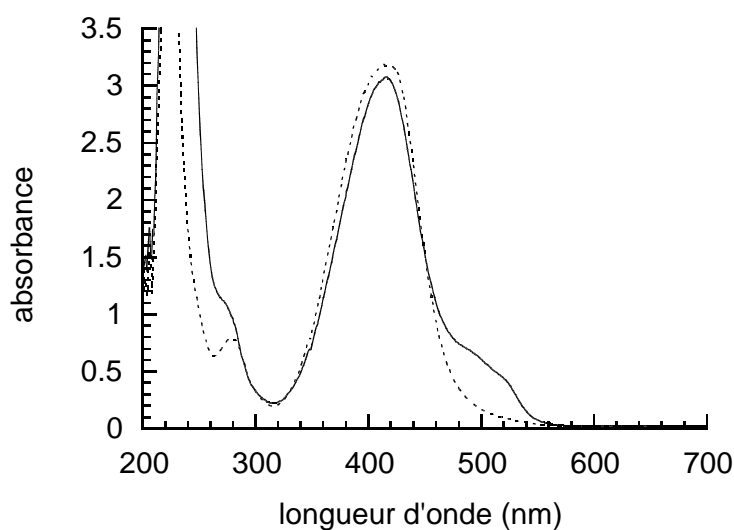


Figure A.4 - Dosage du zinc contenu dans une préparation de protéine α . Les spectres ont été enregistrés avant (trait pointillé) et après (trait plein) addition de PMB (300 μ M) à une solution de PAR (100 μ M) et de protéine α (7,3 μ M contenant 6,2 μ M de zinc) dans un volume final de 100 μ L.

L'ajout de PMB à la solution de PAR et de protéine α provoque l'augmentation immédiate de l'absorbance à 500 nm qui se stabilise dans la minute suivant le mélange. Au delà de 300 nm le spectre est similaire à ceux obtenus avec une source chimique de zinc (figure A.3). La bande à 280 nm correspondant à l'absorption de la protéine devient moins bien résolue du fait de l'augmentation de l'absorbance à 250 nm due à la formation des liaisons S—Hg. L'équation de la droite d'étalonnage permet de calculer la concentration de zinc dans la cuve à partir de l'absorbance lue à 500 nm. La quantité de zinc par monomère de protéine α est ainsi égale au rapport de la concentration de zinc sur la concentration de protéine α dans la cuve.

Cette méthode de dosage a été utilisée pour déterminer le contenu en zinc de nombreuses préparations de protéine α ; la comparaison des valeurs obtenues pour quelques-unes d'entre elles par spectrophotométrie et spectroscopie d'absorption atomique montre que les deux méthodes fournissent des résultats similaires. En particulier, le dosage de zinc par

colorimétrie confirme l'hétérogénéité des quantités de zinc mesurées en fonction des préparations.

A.II.3 - Avantages de la méthode

Outre sa rapidité et sa sensibilité, la méthode colorimétrique présente l'avantage de permettre la distinction entre deux types de zinc présents dans la solution protéique. Le zinc lié par les quatre cystéines du site $\text{Zn}(\text{Cys})_4$ ne peut être dosé que si la modification covalente des cystéines par le PMB est réalisée. Ce type de zinc sera nommé par la suite « zinc spécifique ». Le second type de zinc peut provenir du tampon si celui-ci n'a pas été chélexé. Il peut également s'agir de zinc faiblement lié à la protéine, au niveau de sites non définis différents du site $\text{Zn}(\text{Cys})_4$. Ce type de zinc, accessible au PAR seul qui le complexe directement, est défini par l'expression « zinc non spécifique ». Ainsi, une mesure en deux temps permet de différencier les deux types de zinc : l'ajout de PAR à la solution protéique fournit immédiatement la concentration de zinc non spécifique de l'échantillon. Le PMB provoque ensuite la libération du zinc du site métallique ; la lecture de l'absorbance à 500 nm donne accès à la concentration de zinc total. La concentration de zinc spécifique est calculée par différence entre les deux valeurs obtenues.

Les études précédentes montrent que la protéine α d'*Escherichia coli* contient majoritairement du zinc. La valeur moyenne du rapport Zn/α est du même ordre que celle correspondant à une occupation totale du site métallique de la protéine ($\text{Zn}/\alpha = 1$ soit un atome de zinc par monomère). Les quantités de zinc mesurées sont très variables de préparation à préparation. Un rapport Zn/α très inférieur à 1 suggère notamment la présence d'une proportion non négligeable de formes dépourvues de métal dans la préparation. Il nous a donc paru indiqué de reconsidérer le protocole de préparation de la protéine α en intégrant la question du contenu métallique de l'enzyme, aspect non abordé jusqu'alors.

B - Préparation de la protéine α

La protéine α est préparée à partir de cultures de bactéries réalisées soit en anaérobiose en milieu LB, soit en aérobiose en milieu LB ou M9. Plusieurs méthodes peuvent être employées pour la purifier. Différentes préparations de protéine α ont été obtenues afin d'étudier l'influence du protocole choisi sur le contenu en zinc de l'enzyme purifiée.

B.I - A partir de cultures en milieu LB

B.I.1 - Surexpression et extraction

B.I.1.a - En anaérobiose

La protéine α est surexprimée en anaérobiose depuis plusieurs années au laboratoire à partir du plasmide pRSS portant le gène de la réductase *nrdD* ainsi qu'un site de fixation de la protéine FNR qui contrôle l'expression des gènes du métabolisme anaérobie et en particulier du gène *nrdD*. Ainsi la surexpression de la protéine α est induite par l'anaérobiose. Dans certaines expériences le milieu de culture a été supplémenté en zinc (ZnCl_2 , concentration finale 30-50 μM).

B.I.1.b - En aérobiose

Un nouveau vecteur permettant de surexprimer la protéine α en aérobiose a été construit au laboratoire peu de temps avant le début de ce travail. Ce plasmide appelé pT7 α porte le gène de la réductase *nrdD*. Il a été à l'origine conçu dans le but de surexprimer la protéine α en milieu M9 ; en effet l'absence de croissance des bactéries JM109(DE3) en milieu M9 et en conditions d'anaérobiose empêche l'obtention de la protéine par cette voie. Le vecteur pT7 α permet également la préparation de protéines α en milieu LB. La protéine est surexprimée après induction des cultures à l'IPTG. Dans certaines expériences le milieu de culture a été supplémenté en zinc (ZnCl_2 , concentration finale 40 μM) juste avant l'induction.

Les cultures réalisées ont montré que le taux de surexpression de la protéine α est généralement plus élevé en anaérobiose qu'en aérobiose.

B.I.2 - Extraction

L'extraction est réalisée dans du tampon Tris-HCl 30 mM pH 7,5, KCl 30 mM, DTT 5 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM préparé avec de l'eau ultrapure. Pour certaines expériences 50 μ M de ZnCl_2 ont été ajoutés. Les extraits obtenus après sonication et centrifugation sont débarrassés de l'ADN par traitement au sulfate de streptomycine puis à la DNase. Les protéines sont ensuite précipitées au sulfate d'ammonium saturé à 55%.

B.I.3 - Purification

Deux méthodes sont principalement utilisées pour purifier la protéine α , la chromatographie sur support hydrophobe Butyl Sepharose et la chromatographie d'affinité dATP Sepharose.

B.I.3.a - Purification par chromatographie sur support hydrophobe Butyl Sepharose

Cette chromatographie permet d'obtenir en une étape une grande quantité de protéine α (de l'ordre de la centaine de mg à partir de 5 à 6 L de culture). Le protocole classiquement utilisé a été modifié comme indiqué ci-après.

❖ Ancien protocole

Après précipitation au sulfate d'ammonium le culot protéique est repris dans le minimum de tampon KPi 50 mM pH 7,9. La solution est diluée avec du tampon KPi 50 mM pH 7,9, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,8 M puis injectée sur la colonne Butyl Sepharose équilibrée avec le tampon précédent à un débit de 3 mL/min. La colonne est lavée avec trois volumes du même tampon puis l'élution est effectuée selon un gradient linéaire décroissant de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (de 0,8 à 0 M dans du tampon KPi 50 mM pH 7,9). La figure B.1 présente un chromatogramme

obtenu avec une préparation issue d'une culture en anaérobiose.

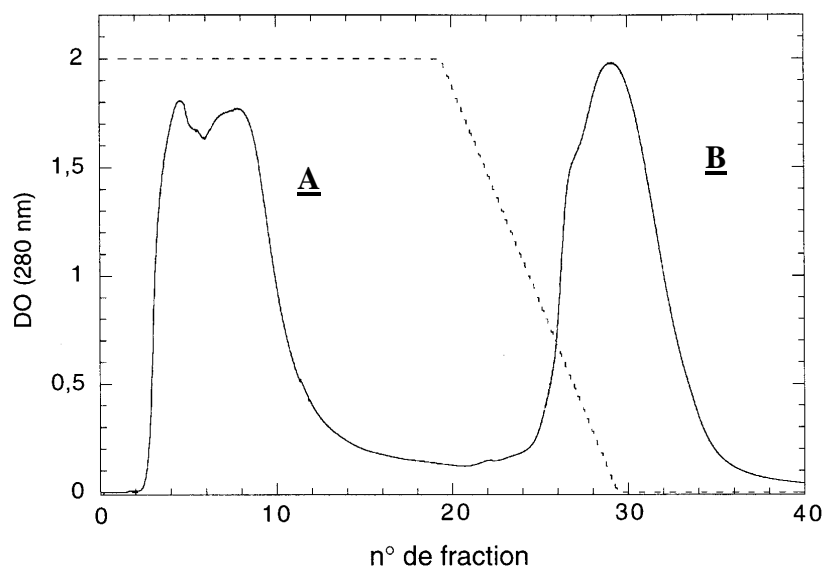


Figure B.1 - Chromatogramme de purification de la protéine α surexprimée en milieu LB par chromatographie sur support hydrophobe Butyl Sepharose (ancien protocole). Les extraits protéiques (450 mg) après précipitation au sulfate d'ammonium sont repris dans du tampon KPi 50 mM pH 7,9, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,8 M puis injectés sur la colonne (30 mL) à un débit de 3 mL/min. Des fractions de 5 mL sont récupérées. Le lavage du gel avec le tampon précédent élimine la plupart des contaminants (pic A). La protéine α est éluée (pic B) avec un gradient linéaire décroissant de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (de 0,8 à 0 M). Le trait pointillé représente l'évolution de la quantité de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (unités arbitraires).

D'après l'analyse des fractions récupérées par électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide le pic A ne contient pas de protéine α ; le lavage de la colonne avec du tampon contenant 0,8 M de sulfate d'ammonium permet d'éliminer les protéines qui ne s'accrochent pas sur la matrice hydrophobe. Le pic B contient majoritairement la protéine α . Les fractions correspondantes sont rassemblées, concentrées et lavées avec du tampon KPi 50 mM pH 7,9. La pureté de la protéine α obtenue est estimée à 75% environ.

◆ Protocole modifié

Dans le nouveau protocole mis au point le gradient de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ n'est plus linéaire mais comporte trois paliers à 0,6, 0,4 et 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La figure B.2 présente un

chromatogramme obtenu dans ces conditions avec une préparation issue d'une culture en aérobiose.

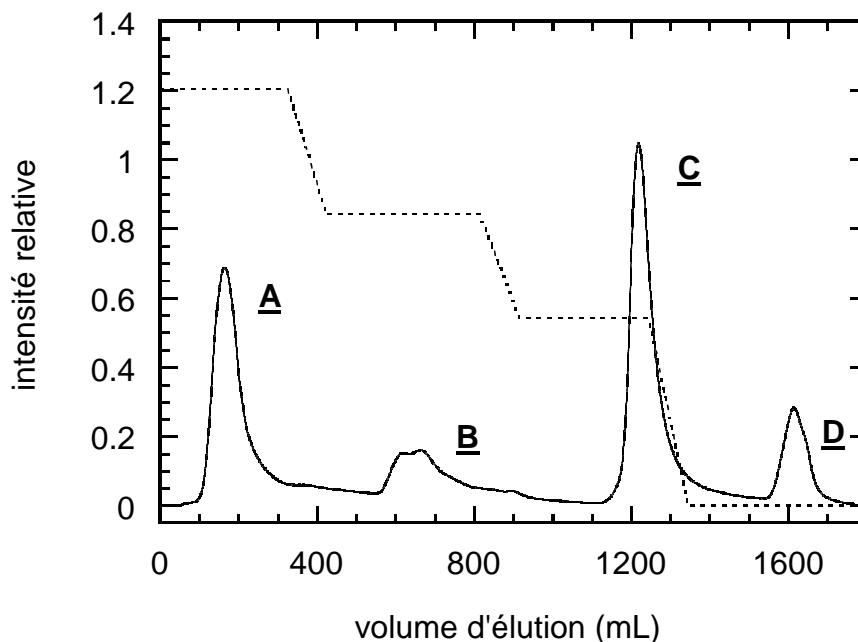


Figure B.2 - Chromatogramme de purification de la protéine α surexprimée en milieu LB par chromatographie sur support hydrophobe Butyl Sepharose (nouveau protocole). Le mélange de protéines (600 mg) obtenu après précipitation au sulfate d'ammonium est repris dans du tampon KPi 50 mM pH 7,9, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,8 M puis injecté sur la colonne (100 mL) à un débit de 3 mL/min. Des fractions de 5 mL sont récupérées. La colonne est lavée avec le tampon précédent puis l'élution est réalisée avec un gradient décroissant de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ incluant trois paliers à 0,6, 0,4 et 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La protéine α est majoritairement éluée dans le pic C. Le trait pointillé représente l'évolution de la quantité de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (unités arbitraires).

Tous les chromatogrammes de purification de la protéine α exprimée en milieu LB présentent un profil à quatre pics similaire à celui de la figure B.2, que la culture soit réalisée en anaérobiose ou en aérobiose. Les pics A et B ne contiennent pas de protéine α ; le lavage de la colonne ainsi que la première phase du gradient permettent d'éliminer la plupart des protéines contaminantes. Les pics C et D contiennent tous deux la protéine α . Le pic C en contient la majeure partie ; les fractions correspondantes sont rassemblées. La pureté de la protéine obtenue est estimée à 85% au minimum. Cette protéine α purifiée est utilisée pour les

études ultérieures. Le profil sur gel d'électrophorèse dénaturante typiquement observé pour de telles préparations est présenté sur la figure B.3 (puits n°2). Dans le pic D la protéine α co-élue avec d'autres protéines présentes en quantités relativement importantes ; la pureté de la protéine α est estimée à 70% au plus. Il faut noter que la quantité et la pureté de la protéine α issue de ce pic sont très variables de préparation à préparation. Cette fraction n'a pas été utilisée dans la suite du travail.

B.I.3.b - Purification par chromatographie d'affinité dATP Sepharose

La chromatographie d'affinité dATP Sepharose est basée sur la fixation spécifique de la protéine α sur une résine Sepharose activée couplée à un ligand dérivé du dATP, le 4-aminophényl- γ -désoxyadénosine triphosphate. L'interaction entre la protéine α et la résine d'affinité s'effectue très probablement au niveau du site allostérique dit « d'activité », qui fixe l'ATP et le dATP. La synthèse de la résine d'affinité est décrite dans la partie Matériels et Méthodes.

La protéine α peut être purifiée par chromatographie d'affinité directement après l'étape de précipitation au sulfate d'ammonium. Dans ce cas une étape de dialyse intermédiaire est nécessaire afin d'éliminer les oligonucléotides résiduels qui empêchent la fixation de la protéine sur la résine. La méthode de purification par affinité permet d'obtenir des préparations de protéine dont la pureté est estimée à 90% au minimum ; c'est pourquoi elle est également utilisée avec des protéines α déjà purifiées par chromatographie sur support hydrophobe lorsqu'un degré de pureté élevé est souhaité pour des applications particulières (expériences quantitatives, préparations destinées à la cristallogénèse...). Les solutions de protéines doivent être chromatographiées à faible débit (0,2 mL/min) pour que la protéine soit efficacement retenue. Ainsi, comparativement à la chromatographie sur support hydrophobe réalisée sur une durée similaire, la chromatographie d'affinité permet l'obtention de quantités plus modestes de protéine α purifiée (de l'ordre de la dizaine de mg).

Le protocole utilisé est relativement simple : la solution protéique diluée (2 mg/mL) est chargée sur la colonne dans un tampon riche en sel (KCl 300 mM) qui défavorise les interactions non spécifiques. Après un lavage de la résine avec 5 à 10 volumes de tampon, la protéine α est éluée avec du tampon contenant 1 mM d'ATP. La figure B.3 présente un gel d'électrophorèse obtenu lors d'une purification de protéine α par chromatographie d'affinité.

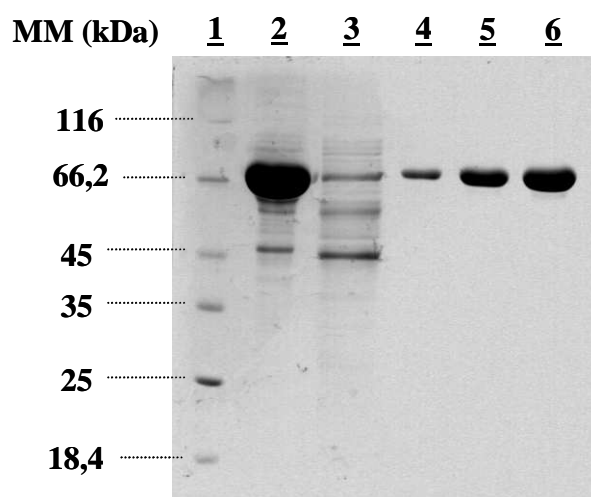


Figure B.3 - Analyse SDS-PAGE d'une purification de protéine α par chromatographie d'affinité d'ATP Sepharose. La solution obtenue après purification par chromatographie sur support hydrophobe (55 mg de protéines) est diluée à 2 mg/mL dans du tampon Tris-HCl 100 mM pH 8, KCl 300 mM puis chargée sur la colonne de d'ATP Sepharose (5 mL). La résine est lavée avec 8 volumes du tampon précédent puis l'élution est effectuée avec 1 mM d'ATP. Des fractions de 3 mL sont récupérées et leur contenu en protéine évalué par la méthode de Bradford. Sur cette figure apparaissent les profils d'électrophorèse de la préparation de protéine α pré-purifiée sur Butyl Sepharose (2), de la fraction de lavage (3) et de la protéine α éluée (4, 5 et 6, quantités croissantes). Les masses moléculaires (MM) indiquées sont celles des marqueurs utilisés (1).

La protéine surexprimée en aérobiose (milieu LB) a été purifiée au préalable par chromatographie sur support hydrophobe puis chargée sur la résine à un débit de 0,2 mL/min dans du tampon Tris-HCl pH 8, KCl 300 mM. Après lavage de la résine la protéine est éluée avec 1 mM d'ATP. Le gel met en évidence l'élimination dans la fraction de lavage des contaminants présents dans la solution protéique obtenue après purification sur colonne de Butyl Sepharose.

B.I.4 - Détermination du contenu en zinc des protéines

Des dosages de zinc ont été effectués sur les différentes préparations de protéines α surexprimées en milieu LB puis purifiées par chromatographie sur support hydrophobe selon le protocole modifié. Ils révèlent que toutes les préparations issues du pic C contiennent plus de 0,75 atome de zinc par monomère, même lorsque le milieu de culture et le tampon d'extraction ne sont pas supplémentés en zinc. L'analyse du contenu en zinc des protéines provenant du pic D n'a pas été entreprise en raison du faible degré de pureté observé. Les protéines purifiées par chromatographie d'affinité contiennent également plus de 0,75 atome de zinc par monomère. Dans tous les cas le dosage de zinc spectrophotométrique indique que le zinc non spécifique est présent dans des proportions tout à fait négligeables par rapport au zinc spécifiquement lié à la protéine.

B.II - A partir de cultures en milieu M9

Deux préparations de protéine α ont été obtenues à partir de cultures en milieu M9, l'une dans des conditions classiques, l'autre dans des conditions contrôlées explicitées ci-après. Seules les modifications apportées au protocole décrit pour l'obtention de protéines en milieu LB seront détaillées.

B.II.1 - En conditions classiques

B.II.1.a - Surexpression et extraction

❖ *Surexpression*

La protéine α est surexprimée en aérobiose à partir du plasmide pT7 α portant le gène de la réductase *nrdD*. Le milieu M9 est complémenté par du glucose (0,2 %), du MgSO_4 (1 mM), de la vitamine B1 (0,5 $\mu\text{g/mL}$) et une solution de FeSO_4 :citrate de sodium (25 μM :75 μM).

◆ Extraction

L'extraction est réalisée dans du tampon Tris-HCl 30 mM pH 7,5, KCl 30 mM, DTT 5 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM préparé avec de l'eau ultrapure. Les extraits sont traités comme indiqué plus haut.

B.II.1.b - Purification

La protéine est purifiée par chromatographie sur support hydrophobe Butyl Sepharose selon le protocole modifié décrit précédemment. Le chromatogramme obtenu est similaire à celui présenté sur la figure B.2.

B.II.2 - En conditions contrôlées

Une préparation de protéine α a été obtenue dans des conditions contrôlées de carence en zinc appliquées lors des étapes de surexpression, extraction et purification.

B.II.2.a - Surexpression et extraction**◆ Surexpression**

La culture des bactéries s'effectue cette fois dans des erlenmeyers de 2 L en plastique préalablement rincés avec de l'eau ultrapure passée sur résine Chelex-100. Le milieu M9 est préparé à partir de poudre commerciale et d'eau chélexée. Les solutions utilisées pour la complémentation et l'induction sont préparées avec de l'eau chélexée.

◆ Extraction

L'extraction est réalisée dans du tampon Tris-HCl 30 mM pH 7,5, KCl 30 mM, DTT 5 mM, EDTA 5 mM, PMSF 1 mM préparé avec de l'eau chélexée. Lors de l'extraction toutes les opérations sont effectuées en utilisant des récipients en plastique, de même qu'au cours des étapes de purification ultérieures.

B.II.2.b - Purification

La protéine est purifiée par chromatographie sur support hydrophobe selon le protocole modifié avec les tampons habituels préparés avec de l'eau chélexée et auxquels sont ajoutés 5 mM d'EDTA. Le chromatogramme de purification est présenté sur la figure B.4.

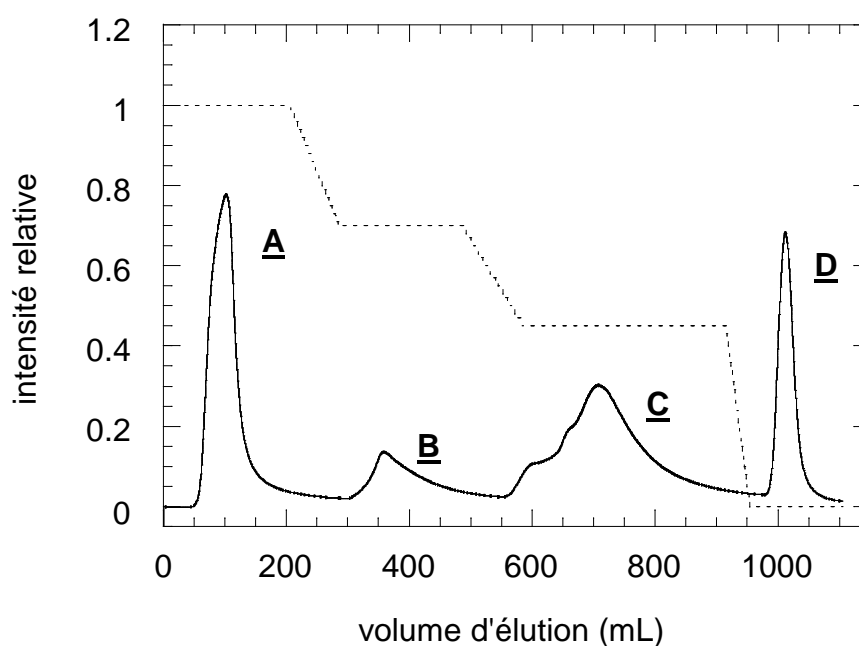


Figure B.4 - Chromatogramme de purification de la protéine α surexprimée en milieu M9 par chromatographie sur support hydrophobe Butyl Sepharose (nouveau protocole). Le mélange de protéines (250 mg) obtenu après précipitation au sulfate d'ammonium est repris dans du tampon KPi 50 mM pH 7,9, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,8 M puis injecté sur la colonne (100 mL) à un débit de 3 mL/min. Des fractions de 5 mL sont récupérées. La colonne est lavée avec le tampon précédent puis l'élution est réalisée avec un gradient décroissant de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ incluant trois paliers à 0,6, 0,4 et 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La protéine α est éluée dans les pics C et D. Le trait pointillé représente l'évolution de la quantité de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (unités arbitraires).

Le profil obtenu est légèrement différent de celui de la figure B.2 : le pic C apparaît assez peu symétrique et le pic D important en comparaison de la moyenne des pics D observés lors des purifications de protéines α exprimées en milieu LB. L'analyse par électrophorèse montre en effet que la première moitié du pic C est majoritairement constituée de protéines contaminantes. Le pic D contient une proportion conséquente de protéine α

associée à de nombreux contaminants. La deuxième moitié du pic C présente une pureté jugée suffisante, équivalente à celle des préparations issues de cultures en milieu LB. Seules les fractions correspondantes sont récupérées.

B.II.3 - Détermination du contenu en zinc des protéines

Les préparations de protéine α obtenues en conditions classiques et en conditions contrôlées contiennent respectivement 0,3 et 0,1 atome de zinc par monomère. Ici encore les chiffres obtenus traduisent la présence de zinc spécifiquement lié au site métallique de la protéine.

B.III - Bilan

Les résultats de dosages de zinc effectués sur les diverses préparations de protéine α sont résumés dans le tableau B.1.

Conditions de préparation	Zn / α
Milieu LB, avec ou sans complémentation en zinc	> 0,75
Milieu M9, sans complémentation en zinc	0,3
Milieu M9, conditions de carence en zinc	0,1

Tableau B.1 - Contenu en zinc de différentes préparations de protéine α en fonction du protocole suivi.

Ces résultats démontrent l'influence du mode de préparation de la protéine sur son contenu en zinc. Ainsi les protéines surexprimées en milieu LB puis purifiées par chromatographie sur support hydrophobe et/ou par chromatographie d'affinité présentent un taux d'occupation du site métallique par le zinc supérieur ou égal à 75%. Au contraire

l'application de conditions visant à réduire au maximum les concentrations de zinc libre dans les milieux de culture et les tampons permet d'obtenir une préparation contenant seulement 10% de zinc. Pour des raisons de commodité cette préparation pauvre en zinc a été nommée « apo α », bien qu'elle ne soit pas totalement dépourvue de zinc.

C - Caractérisation du site Zn(Cys)₄ de la protéine α

Une caractérisation du site à zinc de la protéine a été entreprise. Nous avons notamment recherché des conditions permettant de démétaller une préparation de protéine riche en zinc, dans l'optique d'obtenir une apoprotéine par une voie différente de celle impliquant une préparation en milieu carencé en zinc. L'incorporation de zinc et de cobalt dans la protéine a également été étudiée.

C.I - Démétallation de la protéine α

Des essais de démétallation de la protéine α ont été entrepris pour plusieurs raisons. L'élimination du métal est une manière d'évaluer l'affinité du site métallique de la protéine pour le zinc. De plus, l'obtention de l'apoprotéine pourrait permettre l'incorporation d'un métal donnant lieu à une signature spectroscopique tel que le cobalt. Enfin, l'objectif principal est d'étudier l'influence du zinc sur l'activité ribonucléotide réductase.

Les expériences de démétallation ont été menées avec des protéines surexprimées en milieu LB puis purifiées par chromatographie sur support hydrophobe et /ou d'affinité et dont le rapport Zn/ α est supérieur ou égal à 0,75.

C.I.1 - Etude préliminaire

C.I.1.a - Utilisation de chélateurs de métaux

Un procédé classiquement utilisé pour obtenir une protéine sous forme démétallée

consiste à utiliser un chélateur de métal qui entre en compétition avec la protéine pour la fixation du métal. Deux chélateurs ont été utilisés pour cette étude, l'EDTA et le TPEN dont les structures chimiques sont rappelées sur la figure C.1.

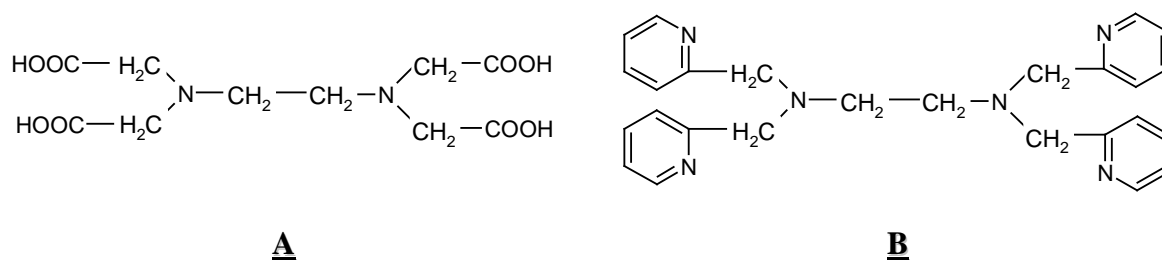


Figure C.1 - Formules chimiques de l'EDTA (A) et du TPEN (B).

◆ Effet de l'EDTA

La protéine α (50 μM , 0,8 Zn/ α) est incubée avec de l'EDTA (5 mM) dans du tampon Tris-HCl 0,1 M pH 8, KCl 50 mM chélexé pendant 24 h à 4°C. La protéine est ensuite débarrassée du chélateur sous ses formes libre et complexée par filtration sur gel. Le dosage de zinc effectué par la méthode colorimétrique montre que la quantité de zinc par monomère de la protéine traitée par l'EDTA est égale à celle de la protéine non traitée. De plus le zinc dosé reste spécifiquement associé au site métallique de la protéine, comme l'indique la nécessité d'ajouter du PMB pour former le complexe Zn(PAR)₂. Ainsi l'EDTA, bien qu'utilisé à des concentrations cent fois supérieures à celles de la protéine, est incapable de déplacer le zinc du site métallique. La constante d'affinité de l'EDTA pour le zinc est égale à 10¹⁴ M⁻¹. Cette expérience de compétition suggère donc que la constante d'affinité de la protéine pour le zinc est supérieure à 10¹⁴ M⁻¹.

◆ Effet du TPEN

Les essais de démétallation ont été poursuivis avec l'utilisation d'un autre chélateur de métal, le TPEN, dont la constante d'affinité pour le zinc est très élevée ($Ka = 10^{16} \text{ M}^{-1}$). La

protéine α est incubée avec des concentrations croissantes de TPEN pendant 7 h puis purifiée par filtration sur gel. La réaction est menée à 4°C et 20 mM de DTT sont ajoutés au mélange ; en effet l'incubation à température ambiante ou en absence de DTT provoque la précipitation de la protéine. La figure C.2 représente la quantité de zinc résiduel par monomère de protéine α déterminée par colorimétrie en fonction de la concentration de TPEN.

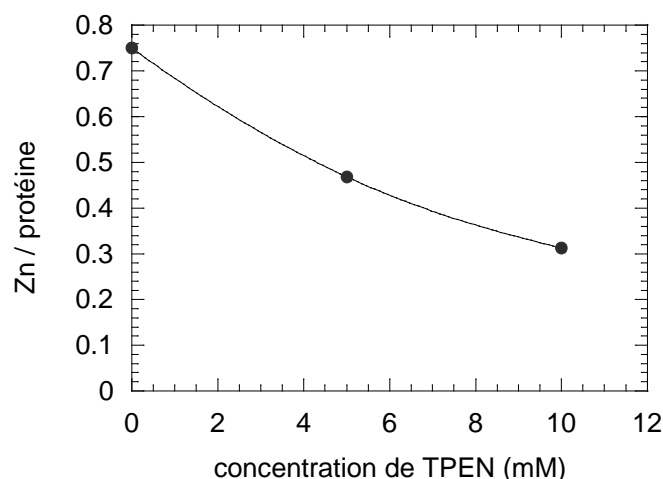


Figure C.2 - Effet du TPEN sur le contenu en zinc de la protéine α .

La protéine α (170 μ M contenant 128 μ M de zinc) a été incubée dans du tampon Tris-HCl 0,1 M pH 8, KCl 50 mM chélexé avec 20 mM de DTT et des concentrations croissantes de TPEN pendant 7 h à 4°C. La protéine a ensuite été purifiée par filtration sur gel afin d'éliminer le DTT et le TPEN. Le contenu en zinc des échantillons a été déterminé à partir d'aliqots par colorimétrie.

La figure C.2 montre que l'ajout de 10 mM de TPEN permet d'éliminer seulement 60% du zinc contenu dans 128 μ M de protéine ; la constante d'association du zinc à la protéine α est donc non seulement supérieure à celle de l'EDTA, mais également supérieure à celle du TPEN. La constante apparente d'association du zinc à la protéine α a été déterminée à partir de l'équation reliant les concentrations et constantes d'association des réactifs (chélateur et protéine), rappelée dans la partie Matériels et Méthodes. Cette constante a été estimée à $5 \times 10^{17} \text{ M}^{-1}$ à 4°C et pH 8.

C.I.1.b - Utilisation d'un réactif organomercurique

La modification covalente des cystéines par un réactif organomercurique est une autre manière d'éliminer le zinc contenu dans la protéine. Cette méthode est d'ailleurs mise à profit pour effectuer le dosage du zinc par spectrophotométrie comme exposé précédemment : la réaction des cystéines avec le PMB provoque la libération du zinc qui peut être directement complexé par des chélateurs présentant des constantes d'affinité pour le zinc modérées tels que le PAR ($K_a = 2 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$). L'avantage de cette méthode est qu'elle permet la libération totale du zinc de la protéine. Néanmoins la modification chimique des cystéines est nécessaire, contrairement à la méthode de chélation directe. Cet inconvénient doit être pris en compte si une étude fonctionnelle de la protéine dépourvue de métal est envisagée.

Lors de la réaction de dosage du zinc un large excès de PMB par rapport à la protéine α est ajouté ; afin d'évaluer la quantité de PMB juste nécessaire pour entièrement démétaller la protéine, une expérience de titrage du site métallique a été réalisée. Des aliquots de PMB sont successivement ajoutés à une solution de protéine α contenant du PAR et la libération du zinc est suivie par lecture de la DO à 500 nm. La courbe de titrage obtenue est présentée sur la figure C.3.

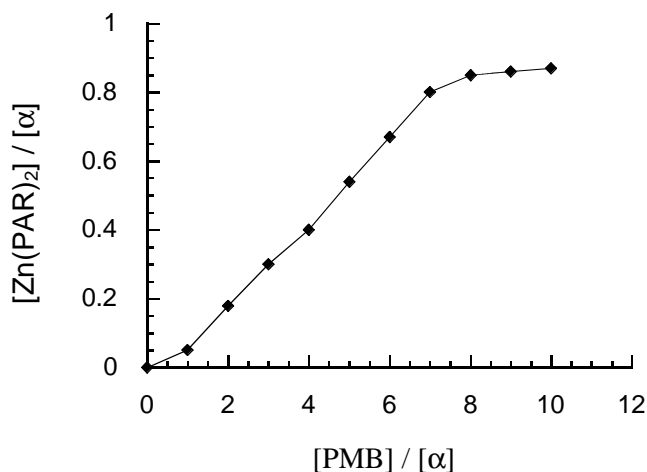


Figure C.3 - Titrage du site à zinc de la protéine α . La protéine α ($8 \mu\text{M}$ contenant $6,8 \mu\text{M}$ de zinc) a été incubée dans du tampon Tris-HCl $0,1 \text{ M}$, pH 8, KCl 50 mM chélexé avec $100 \mu\text{M}$ de PAR dans une cuve en quartz de $100 \mu\text{L}$. Des aliquots de PMB de $2 \mu\text{L}$ ont été ajoutés et la formation du complexe Zn(PAR)_2 suivie par la mesure de la DO à 500 nm .

Le graphe de la figure C.3 comporte deux parties. Dans la première partie la quantité de complexe Zn(PAR)_2 formé est proportionnelle à la quantité de PMB ajouté ; un plateau est ensuite atteint lorsque le PAR a complexé tout le zinc initialement contenu dans la protéine α . En fonction des essais six à huit équivalents de PMB sont nécessaires pour entièrement démétaller la protéine α .

C.I.2 - Essais de préparation de l'apoprotéine

Les expériences de démétallation précédentes ont montré qu'il est possible de déplacer le zinc contenu dans la protéine α , même si dans les conditions utilisées l'élimination du métal n'était que partielle ou nécessitait une modification chimique de la protéine. L'étude a été poursuivie dans le but d'obtenir une apoprotéine α à partir de la protéine métallée.

L'incubation de la protéine α (170 μM) avec du TPEN (10 mM) pendant 7 h à 4°C permet d'éliminer environ 60% du zinc de la protéine. Les conditions utilisées ont été modifiées de manière à augmenter ce pourcentage. Cependant l'élévation de la concentration du TPEN ainsi que l'incubation du mélange à température ambiante provoquent la précipitation de la protéine au bout du temps relativement court de quelques dizaines de minutes après le début de l'expérience. L'utilisation de chélateurs n'a donc pas permis d'obtenir une préparation de protéine α complètement dépourvue de zinc.

L'ajout de PMB à la protéine α conduit à la formation d'un dérivé mercurique covalent. En réalité cette réaction d'oxydation est réversible ; l'emploi de DTT (ou de β -mercaptoéthanol) permet l'élimination des groupes mercuribenzoates et la régénération des cystéines de la protéine, comme le schématise la figure C.4. La modification réversible des cystéines peut ainsi constituer une méthode adaptée à la préparation d'une apoprotéine à partir de la forme métallée. Ce procédé nous a semblé d'autant plus prometteur que le PMB provoque la libération rapide et totale du zinc contenu dans la protéine.

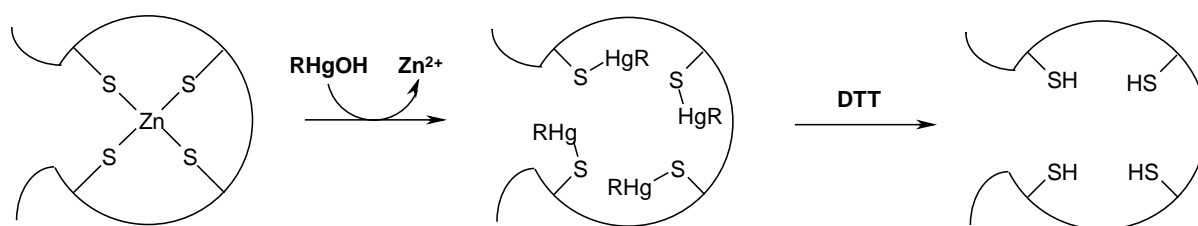


Figure C.4 - Modification réversible des cystéines du site métallique de la protéine α par le PMB et le DTT. (R = groupe benzoate)

Les essais de démétallation ont été réalisés selon trois étapes successives de modification chimique des cystéines par le PMB, d'élimination du zinc de la solution protéique et de réduction par le DTT. La première étape ne pose pas de problème particulier : l'ajout de 10 équivalents de PMB par rapport à la protéine provoque la libération rapide du zinc. Cependant l'élimination du zinc se traduit par la précipitation du dérivé mercurique de la protéine, quelle que soit la méthode utilisée pour débarrasser la solution du métal (lavage de la protéine avec du tampon chélexé, filtration sur gel avec ou sans ajout préalable de chélateur, dialyse). Le taux de précipitation de la protéine est variable en fonction des conditions utilisées mais l'apparition d'un précipité quasiment systématique. Dans certains cas rares la fraction soluble du dérivé mercurique de la protéine a pu être isolée. L'analyse du contenu en zinc effectuée sur ces préparations montre que les protéines sont pratiquement dépourvues de métal ($\text{Zn}/\alpha < 0,1$). Malheureusement l'ajout de DTT à la solution provoque la précipitation de la protéine en quelques minutes, empêchant l'obtention de l'apoprotéine sous forme soluble.

L'étape d'élimination du zinc intermédiaire est mise en œuvre afin d'éviter toute réincorporation de métal dans la protéine au cours du traitement par le DTT. Une expérience de démétallation en deux étapes a tout de même été entreprise : la réaction entre le PMB et la protéine est menée en présence d'EDTA en excès puis suivie de l'ajout de DTT *in situ*. Les petites molécules (EDTA, dérivé mercurique et DTT) sont alors éliminées par filtration sur

gel. La protéine obtenue est cette fois soluble ; elle contient toutefois 50% de la quantité de zinc initiale. Il semble donc que la protéine ait effectivement récupéré du zinc lors de l'étape de réduction par le DTT. Ce protocole ne permet donc pas d'obtenir l'apoprotéine α . De nombreuses variantes expérimentales ont été testées, mais la modification des conditions de tampons, de température, de concentrations des réactifs n'a pas permis d'augmenter la solubilité du dérivé mercurique ni celle de l'apoprotéine.

Des essais de démétallation par oxydation des cystéines de la protéine α ont également été menés. La protéine α (50 μ M contenant 40 μ M de zinc) a été incubée à 4°C dans du tampon chélexé avec 2 mM d' H_2O_2 pendant 15 h puis purifiée par filtration sur gel. Ce traitement ne modifie pas la quantité de zinc spécifiquement lié à la protéine, suggérant que l' H_2O_2 ne provoque pas d'oxydation des cystéines du site à zinc. De même aucune libération de zinc n'est observée lorsque la DO à 500 nm d'une solution contenant la protéine α , du PAR et différentes concentrations d' H_2O_2 est suivie au cours du temps.

C.II - Remétallation de la protéine α

L'affinité élevée de la protéine α pour le zinc est à l'origine de la difficulté à obtenir une préparation entièrement démétallée par traitement chimique de protéines riches en zinc. L'incorporation de zinc dans la protéine a été étudiée afin de déterminer si à l'inverse le site métallique de préparations démétallées est susceptible de fixer le zinc ajouté à la solution. Les expériences ont été réalisées avec différentes préparations de protéines α déficientes en zinc après purification ou consécutivement à un traitement chimique.

C.II.1 - A partir d'une protéine α modifiée par le PMB

La réincorporation de zinc dans le site métallique de la protéine α a été suivie en mesurant l'absorbance à 500 nm au cours du temps d'une solution de protéine purifiée (0,8 Zn/ α) contenant du PAR et du PMB et à laquelle est ajouté du DTT. La cinétique obtenue est présentée sur la figure C.5.

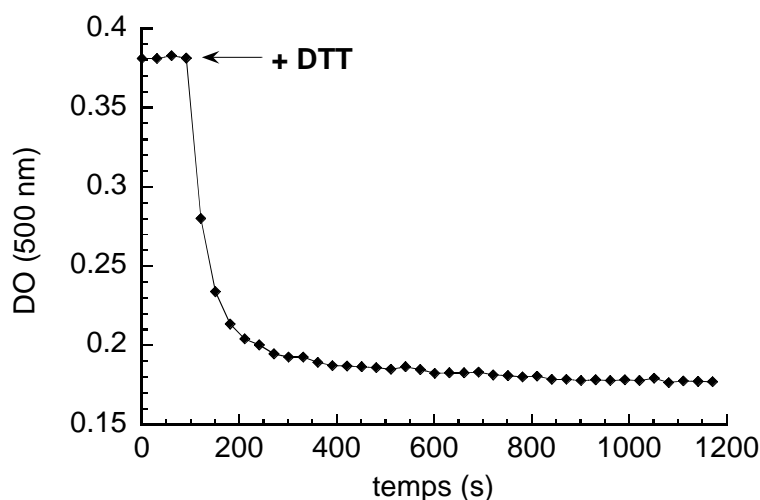


Figure C.5 - Cinétique de réincorporation du zinc dans le site métallique de la protéine α . La protéine α (4 μ M contenant 3,3 μ M de zinc) dans du tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8, KCl 50 mM chélexé a été traitée par 50 μ M de PMB en présence de 100 μ M de PAR dans une cuve en quartz de 100 μ L puis 40 μ M de DTT ont été ajoutés après 90 s de réaction. La disparition du complexe Zn(PAR)_2 a été suivie au cours du temps par la mesure de la DO à 500 nm.

De manière attendue l'ajout de PMB à la solution contenant la protéine α et le PAR provoque la formation du complexe Zn(PAR)_2 . Ainsi l'absorbance à 500 nm est stable durant les 90 s de la première partie de la cinétique, la valeur mesurée (0,38) correspondant à la libération de 0,8 atome de zinc par monomère de protéine. Dans la deuxième phase la réduction des liaisons S-Hg par le DTT s'accompagne d'une diminution puis d'une stabilisation de l'absorbance à 500 nm avec une valeur de 0,18 après 900 s de réaction. Cette décroissance de l'absorbance à 500 nm qui traduit la diminution de la concentration du complexe Zn(PAR)_2 est compatible avec la réassociation rapide ($t_{1/2} = 120$ s) de 90% du zinc total au site métallique de la protéine. Une expérience complémentaire a été réalisée afin d'étudier l'effet du DTT, qui présente une constante d'association avec le zinc de 10^{12} M^{-1} , sur le complexe Zn(PAR)_2 . L'ajout de 40 μ M de DTT à une solution contenant 100 μ M de PAR et 4 μ M de Zn(OAc)_2 ne provoque aucun changement de l'absorbance à 500 nm. Ainsi le DTT à la concentration utilisée n'affecte pas la fixation du zinc à 100 μ M de PAR en absence de protéine α . La décroissance de l'absorbance à 500 nm dans les conditions de la

figure C.5 montre donc bien la capacité de l'apoprotéine α à ré-extraire rapidement le zinc du complexe $\text{Zn}(\text{PAR})_2$ après régénération des groupes thiols des cystéines par le DTT.

C.II.2 - A partir d'une protéine α traitée au TPEN

L'étude de reméallation a été poursuivie avec une préparation de protéine partiellement déméallée par le TPEN. La protéine α (250 μM , 0,8 Zn/α) est incubée avec du DTT (5 mM) et du TPEN (5,5 mM) dans du tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8, KCl 50 mM chélexé pendant 3 h à 4°C puis purifiée par filtration sur gel. La protéine récupérée (200 μM) est alors incubée avec du DTT (4 mM) et 5 équivalents de $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ pendant une heure à 4°C. La protéine est dessalée par filtration sur gel après ajout d'EDTA (1 mM). L'analyse du contenu en zinc de la protéine traitée au TPEN confirme l'élimination partielle du métal : la préparation contient à ce stade 0,46 atome de zinc par monomère. Après traitement par le zinc le rapport Zn/α atteint 0,82 ; de plus la nécessité d'ajouter du PMB à la solution dosée pour constater la formation du complexe $\text{Zn}(\text{PAR})_2$ montre que le zinc est spécifiquement associé au site métallique de la protéine. Cette expérience met en évidence la capacité de la population de protéines déméallées par le TPEN à réincorporer du zinc exogène en conditions réductrices.

C.II.3 - A partir de préparations de protéine α pauvres en zinc

Selon une démarche similaire à celle utilisée avec la protéine traitée par le TPEN, la méallation d'une préparation de protéine purifiée contenant naturellement peu de zinc a été étudiée. La protéine α (114 μM) contenant 0,19 zinc par monomère est incubée dans du tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8, KCl 50 mM chélexé avec 5 équivalents de $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ et 5 mM de DTT pendant 3 h à 4°C. La protéine est dessalée par filtration sur gel après ajout d'EDTA (1 mM). Après ce traitement la protéine contient 0,53 zinc par monomère dans le site métallique. Ainsi une protéine α déficiente en zinc incorpore partiellement du zinc exogène dans son site métallique en conditions réductrices.

C.III - Incorporation de cobalt dans la protéine α

Une méthode couramment employée pour étudier les sites métalliques des protéines fixant du zinc consiste à remplacer l'ion Zn^{2+} silencieux en spectroscopie par l'ion Co^{2+} . En effet les spectres d'absorption électroniques des protéines à cobalt ainsi obtenues renseignent sur le type, le nombre et la géométrie des ligands du métal. Le cobalt est généralement introduit dans la protéine soit à partir d'une préparation contenant du zinc, soit par surexpression de la protéine en milieu minimum supplémenté avec une source de Co^{2+} .

C.III.1 - Essais de substitution du zinc par du cobalt

Il est théoriquement possible d'obtenir une protéine fixant du cobalt à partir de l'apoprotéine, elle-même préparée par démétallation de la protéine à zinc. Cette méthode n'a pu être exploitée dans le cas de la protéine α , dont la forme apo est trop instable pour être isolée. Une autre procédure utilise la modification réversible des cystéines de la protéine par le PMB, d'une manière similaire à celle schématisée sur la figure C.4 : la protéine est incubée avec le réactif mercurique puis lavée avec du tampon chélexé contenant du $CoCl_2$, avant d'être réduite par le DTT. Les différents essais réalisés ont conduit à la précipitation de la protéine, tout comme les expériences de substitution directe par dialyse de la protéine à zinc contre du tampon chélexé supplémenté en $CoCl_2$.

C.III.2 - Préparation de la protéine αCo

L'incorporation de cobalt dans le site métallique d'une protéine peut être réalisée en surexprimant la protéine en présence d'une source de cobalt(II) et dans des conditions visant à réduire les concentrations des métaux contaminants, en particulier le zinc dans le cas des métalloprotéines à zinc.

C.III.2.a – Surexpression et purification de la protéine αCo

La protéine nommée « αCo » a été obtenue comme indiqué dans la partie Matériels

et Méthodes. En résumé, la protéine a été surexprimée en milieu M9 préparé avec de l'eau chélexée dans des erlens en plastique. Le cobalt est ajouté sous forme de CoCl_2 (10 à 50 μM) juste avant l'induction. La protéine a ensuite été purifiée par chromatographie d'affinité dATP Sepharose avec éventuellement une étape préalable de chromatographie sur support hydrophobe Butyl Sepharose, selon les essais réalisés. Les tampons utilisés pour l'extraction et la purification sont passés sur résine Chelex 100 avant utilisation.

C.III.2.b - Caractéristiques spectrales de la protéine αCo

La figure C.6 montre un exemple de spectre d'absorption UV-visible de la protéine αCo purifiée.

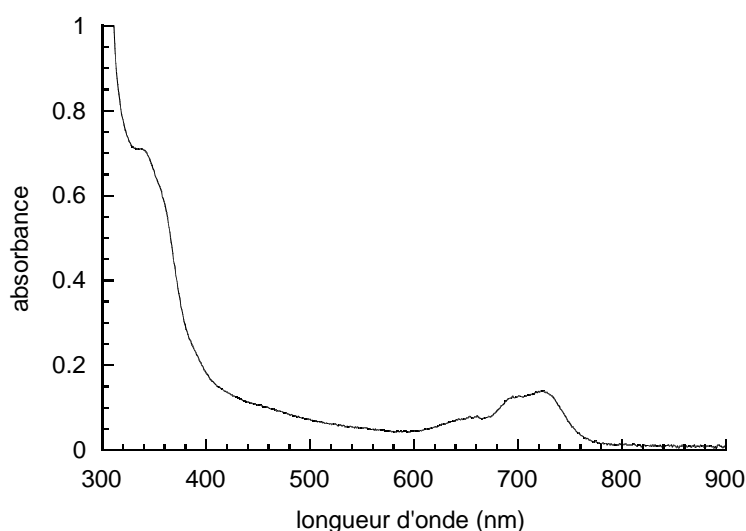


Figure C.6 - Spectre d'absorption UV-visible de la protéine αCo . La protéine αCo purifiée par chromatographies sur support hydrophobe puis d'affinité a été diluée à 335 μM (27 mg /mL) dans du tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8, KCl 50 mM chélexé.

La position des bandes d'absorption observées est compatible avec la présence d'une sphère de coordination tétrathiolate autour du cobalt. En effet la bande intense centrée à 340 nm résulte du transfert de charge entre le Co(II) et les atomes de soufre des ligands cystéines. Les bandes d'absorption présentes dans la région du rayonnement visible sont dues aux

transitions électroniques d-d du métal ; ces bandes à 650, 695 et 720 nm sont typiquement observées sur les spectres d'absorption UV-visible d'autres protéines incorporant du cobalt sous forme d'entité CoS_4 , telles que la rubrédoxine (May 1978), la métallothionéine (Good 1986), une méthionyl-ARNt synthétase (Landro 1993), la sous-unité McbB de la MccB17 synthétase (Zamble 2000) ou la protéine HypA d'*E. coli* (Atanassova 2005). D'après les valeurs des coefficients d'extinction molaire associés aux bandes d'absorption caractéristiques disponibles dans la littérature, nous avons estimé que la protéine αCo contient au maximum 0,3 atome de cobalt par monomère. Plusieurs préparations de protéines α surexprimées en présence de cobalt ont été obtenues. Le pourcentage d'incorporation de cobalt dans la protéine n'a pu être augmenté malgré les précautions prises pour minimiser les contaminations en zinc.

C.III.2.c - Effet du zinc sur la protéine αCo

Les spectres UV-visible de la protéine αCo enregistrés avant et après addition de 1,5 équivalent de $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ sont représentés sur la figure C.7.

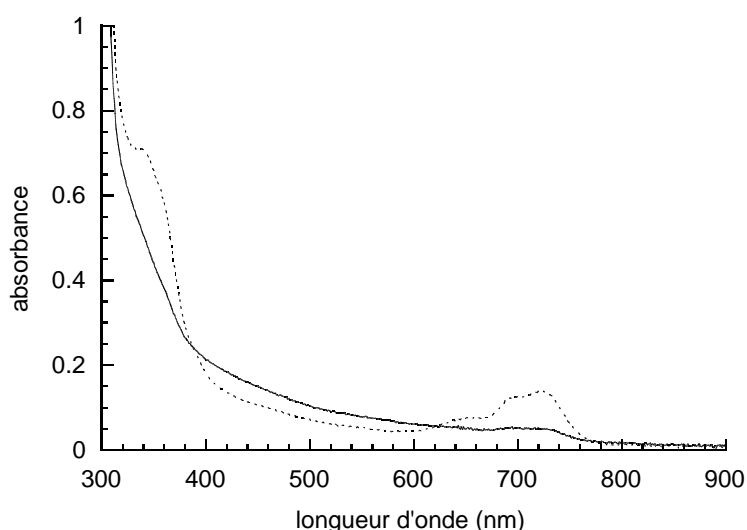


Figure C.7 - Effet du zinc sur la protéine αCo étudié par spectroscopie d'absorption UV-visible. La protéine αCo a été diluée à 335 μM dans une cuve de 100 μL avec du tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8, KCl 50 mM chélexé (trait pointillé). Un nouveau spectre a été enregistré 60 min après l'addition de 500 μM de $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ (trait plein).

L'ajout de zinc à la solution de protéine α Co provoque la diminution progressive de l'intensité de la bande à 340 nm ainsi que de celle des bandes du visible caractéristiques de la présence de cobalt lié par quatre cystéines. Cette expérience suggère que le zinc est capable de déplacer le cobalt du site métallique de la protéine. Toutefois, contrairement à certains exemples de la littérature (Frankel 1987 ; Jakob 2000), la réaction d'échange n'est pas immédiate puisque la bande d'absorption correspondant aux transitions d-d n'a pas totalement disparu au bout d'une heure de réaction.

D - Etude du rôle du site $\text{Zn}(\text{Cys})_4$ de la protéine α

L'importance du site $\text{Zn}(\text{Cys})_4$ pour l'activité ribonuléotide réductase de la protéine α a été suggérée lors des études précédentes réalisées sur les quatre mutants Cys→Ala du site métallique : ceux-ci ne présentent aucune activité CTP réductase significative et ne forment pas le radical glycinyle essentiel à la catalyse (Logan 2003). Nous nous sommes donc attachés à comprendre le rôle du site à zinc dans l'acquisition de ce radical.

D.I - Zinc et activité ribonucléotide réductase : première étude

Les premières études ont visé à déterminer s'il existe un lien entre contenu en zinc et activité RNR de la protéine. En effet la mutation des cystéines du site métallique induit une modification des propriétés de fixation du zinc et/ou de la conformation de ces protéines, à l'origine de la perte de l'activité enzymatique. Pour cela des expériences de corrélation entre contenu en zinc et activité RNR ont été menées, d'une part avec différentes préparations de protéine α , d'autre part avec une préparation de protéine α partiellement démétallée.

D.I.1 - Utilisation de différentes préparations de protéine α

Les contenus en zinc et activités RNR de préparations de protéine α disponibles au début de ce travail sont rassemblés dans le tableau D.1.

Protéine	Zn / α	Activité spécifique (nmoles min ⁻¹ mg ⁻¹)
$\alpha^{3.5.02}$	1,4	360
$\alpha^{31.7.03}$	0,38	65
$\alpha^{2.12.03}$	0,19	112
$\alpha^{13.01.04}$	0,76	395
$\alpha^{14.01.04}$	0,82	404
α C644A	0,03	< 1
α C662A	0,14	< 1

Tableau D.1 - Activité RNR et contenu en zinc de quelques préparations de protéines α sauvages et mutées.

L'étude montre que l'activité RNR des protéines utilisées n'est pas directement corrélée à leur contenu en zinc. Toutefois les enzymes qui incorporent le moins de zinc sont globalement les moins actives. En particulier les très faibles quantités de zinc des protéines α C644A et α C662A semblent pouvoir être mises en parallèle avec l'activité négligeable de ces deux mutants. Ces résultats ne permettent donc pas d'établir une relation linéaire entre quantité de zinc et activité enzymatique, mais suggèrent que le zinc exerce un effet positif sur l'activité RNR.

D.I.2 - Utilisation d'une préparation de protéine α traitée au TPEN

Afin d'éliminer les éventuels biais liés à l'utilisation de préparations de protéine α différentes, l'expérience de corrélation a été reproduite avec une même préparation de protéine partiellement démetallée. D'une manière analogue à celle décrite au paragraphe

C.I.1, la protéine α a été incubée avec du TPEN à 4°C. Le contenu en zinc et l'activité enzymatique des échantillons prélevés sont présentés dans le tableau D.2.

Protéine	Zn / α	Activité spécifique (nmoles min ⁻¹ mg ⁻¹)
α (t_0)	0,86	690
α (t_1)	0,53	630
α (t_2)	0,41	600

Tableau D.2 - Activité RNR et contenu en zinc d'une préparation de protéine α partiellement démétaillée par le TPEN. La protéine α (120 μ M) a été incubée avec du TPEN (4,7 mM) à 4°C. Des aliquots ont été prélevés avant (t_0) et après ($t_1=3$ h, $t_2=30$ h) ajout du chélateur. La protéine a été purifiée par filtration sur gel puis son contenu en zinc mesuré par colorimétrie. L'activité RNR a été déterminée dans des conditions visant à réduire les contaminations en zinc.

Cette expérience confirme l'effet positif du zinc sur l'activité RNR : l'élimination de 52% du zinc s'accompagne de la diminution, certes modeste (13%), de l'activité spécifique. Elle ne permet cependant pas de déduire un facteur de proportionnalité entre contenu en zinc et activité enzymatique.

D.I.3 – Utilisation d'une préparation de protéine α pauvre en zinc

L'incubation d'une protéine α contenant initialement 0,19 zinc par monomère avec du DTT et du Zn(OAc)₂ permet d'augmenter le rapport Zn/ α à 0,53 (paragraphe D.I.2). L'activité RNR de la préparation avant et après traitement a été mesurée. Les résultats sont présentés dans le tableau D.3.

Protéine	Zn / α	Activité spécifique (nmoles min ⁻¹ mg ⁻¹)
Non traitée	0,19	23
Traitée avec Zn(OAc) ₂ / DTT	0,53	95

Tableau D.3 - Effet de l'incorporation de zinc dans la protéine α sur l'activité RNR. La protéine α (114 μ M) contenant 0,19 zinc par monomère a été incubée dans du tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8, KCl 50 mM chélexé avec 5 équivalents de Zn(OAc)₂ et 5 mM de DTT pendant 3 h à 4°C puis dessalée par filtration sur gel après ajout d'EDTA (1 mM). Le contenu en zinc des échantillons a été déterminé par colorimétrie.

La protéine α déficiente en zinc présente initialement une très faible activité spécifique. Il apparaît que l'incorporation de zinc consécutive au traitement réalisé permet une réactivation partielle de cette protéine.

D.II – Zinc et intégrité structurale des protéines

Avec les expériences réalisées pour comprendre le rôle du site métallique de la protéine α , nous avons été amenés à prendre en compte un nouvel élément relatif à la structure des protéines α sauvages et mutées utilisées jusqu'alors. Il est ainsi apparu que la chaîne polypeptidique des différentes protéines α purifiées n'était pas toujours intacte. Cette variabilité de la séquence des protéines a fait l'objet de l'analyse par spectrométrie de masse présentée ci-après. La relation entre intégrité structurale et contenu en zinc des protéines a notamment été étudiée.

D.II.1 - Existence d'une forme tronquée de la protéine α

D.II.1.a - Mise en évidence

L'existence d'une forme tronquée de la protéine α a été découverte lors de l'analyse

par spectrométrie de masse MALDI-TOF de la protéine nommée « apo α », surexprimée et purifiée dans des conditions de carence en zinc. La figure D.1 présente les spectres de masse obtenus avec une préparation de protéine α intacte et avec la protéine « apo α ».

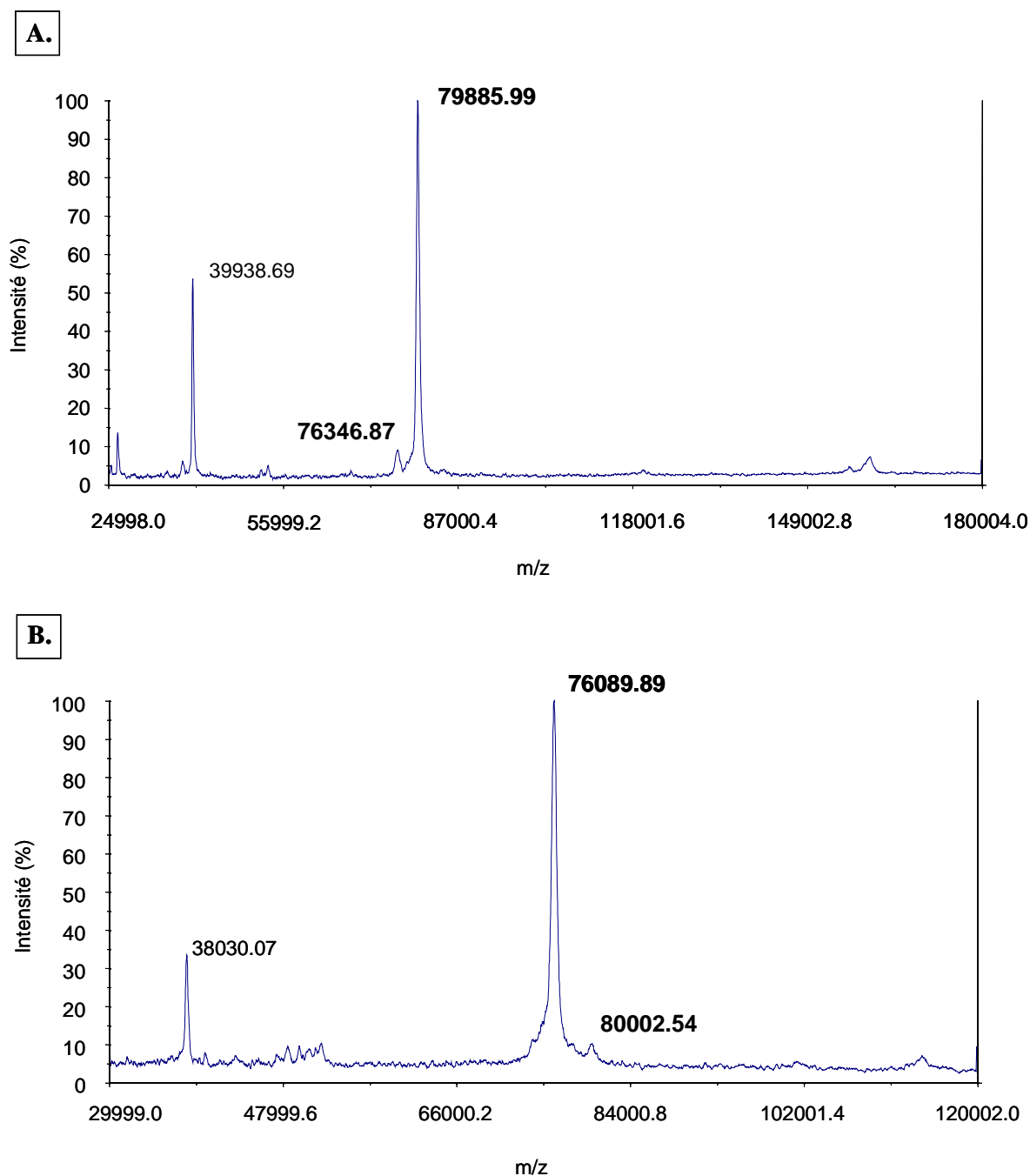


Figure D.1 - Spectres de masse MALDI-TOF d'une préparation de protéine α intacte (A.) et de la protéine «apo α » (B.). Les pics dont les valeurs de m/z sont notées en gras correspondent aux espèces ioniques $[M+H]^+$ où M représente la molécule de protéine α monomérique intacte ou tronquée.

Le spectre de la protéine intacte présente un pic majoritaire à $m/z = 79885$ Da correspondant à l'ion monochargé de la réductase monomérique ($z = 1$). La présence de l'ion dichargé est visible au niveau du pic à $m/z = 39938$ Da. La masse moléculaire calculée de la protéine α d'*E. coli* est de 80023 Da. La protéine utilisée pour cette expérience présente une masse compatible avec la masse théorique attendue, étant donné la précision de la méthode d'analyse. La situation est différente dans le cas de la protéine « apo α » : le pic majoritaire apparaît cette fois à $m/z = 76089$ Da. Cette masse est significativement plus faible que celle de la protéine intacte et témoigne de la présence d'une forme tronquée de la chaîne polypeptidique. La différence de masse entre les formes intacte et tronquée (3800 Da) est compatible avec la perte d'une trentaine d'acides aminés. Le fait que le fragment correspondant ne représente qu'environ 5% de la longueur totale du polypeptide permet d'évaluer les proportions relatives des deux formes présentes dans un même échantillon. Une forme tronquée ($m/z = 76346$) est également détectée dans la préparation correspondant au spectre A. Elle reste cependant très minoritaire par rapport à la forme intacte dans ce cas.

D.II.1.b - Généralisation

Afin d'évaluer l'étendue du phénomène de coupure de la chaîne polypeptidique observé avec la protéine « apo α », l'analyse structurale par spectrométrie de masse a été reproduite avec d'autres types de réductases. Les spectres obtenus avec les protéines α Co, α C644A, α C647A, α C662A et α C665A sont rassemblés sur les figure D.2 et D.3.

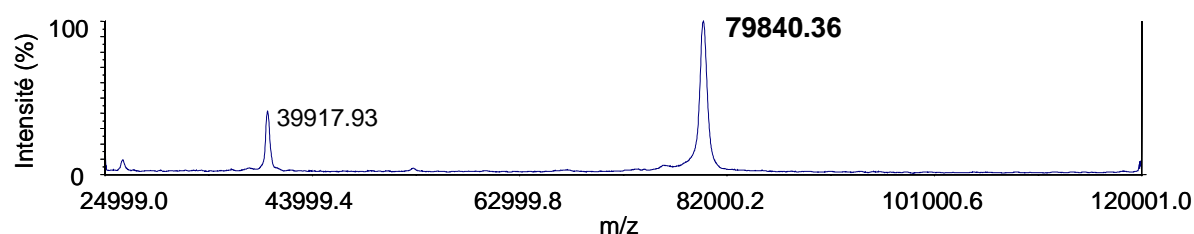


Figure D.2 - Spectre de masse MALDI-TOF de la protéine α Co. Le pic dont la valeur de m/z est notée en gras correspond à l'espèce ionique $[M+H]^+$ où M représente la molécule de protéine α monomérique.

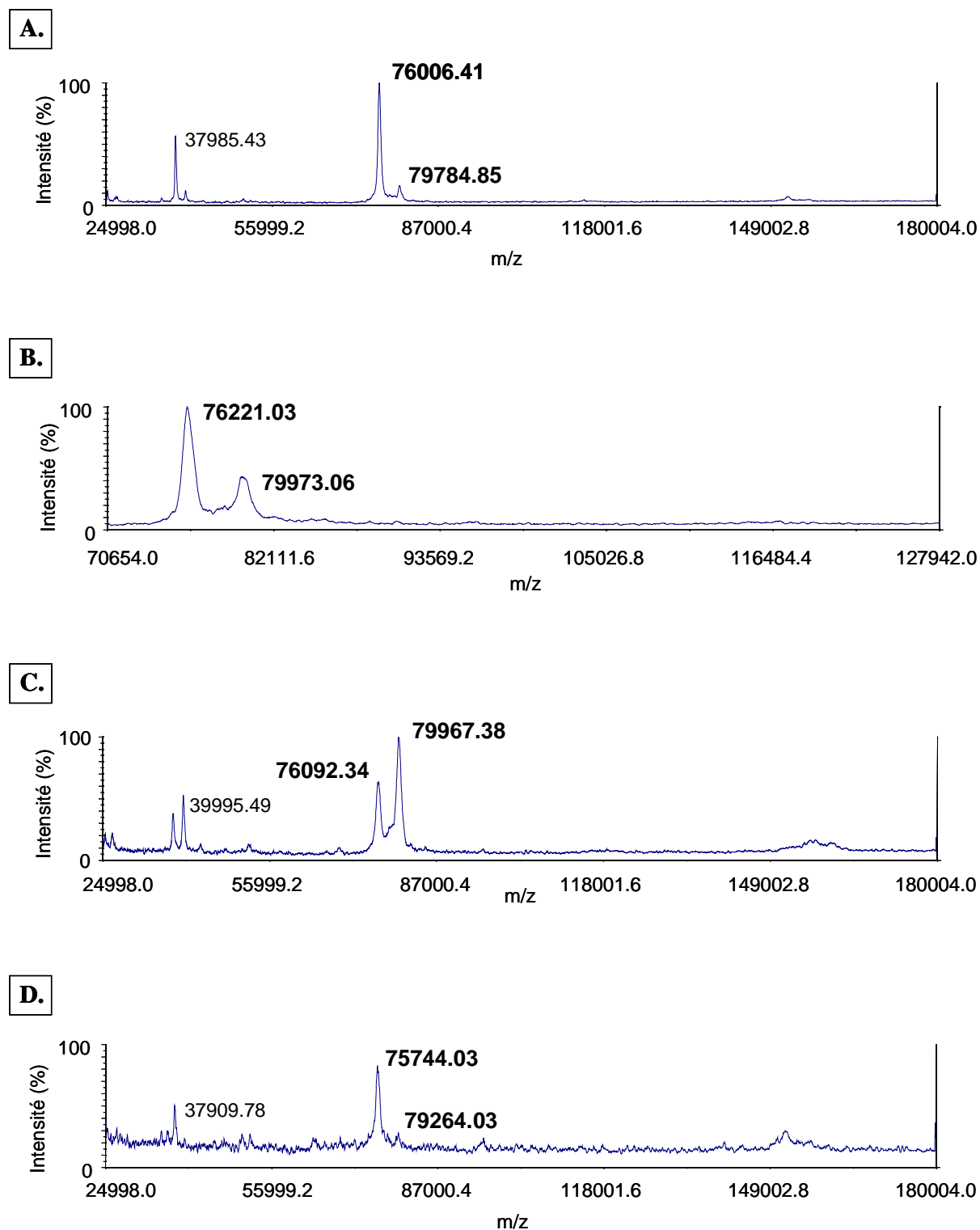


Figure D.3 - Spectres de masse MALDI-TOF des protéines α C644A (A.), α C647A (B.), α C662A (C.) et α C665A (D.). Les pics dont les valeurs de m/z sont notées en gras correspondent aux espèces ioniques $[M+H]^+$ où M représente la molécule de protéine α monomérique intacte ou tronquée.

Comme le montrent les figures D.2 et D.3, si la protéine α Co est pratiquement intacte, les préparations de protéines α C644A, α C647A, α C662A et α C665A contiennent toutes une forme tronquée apparaissant sur les spectres à une masse voisine de 76000 Da, donc proche de la valeur déterminée pour la protéine « apo α ». Les proportions relatives des formes intacte et tronquée sont très variables en fonction de la protéine considérée. La forme tronquée est tout de même globalement majoritaire par rapport à la forme intacte. Cette expérience suggère que la coupure de la chaîne polypeptidique de la protéine α n'est pas une manifestation isolée observée fortuitement avec une préparation donnée, mais bien une caractéristique structurale à prendre en compte lors de l'étude de tout type de réductase.

D.II.2 - Identification du site de coupure

Pour préciser le site de coupure de la chaîne polypeptidique, les protéines α C644A, α C647A, α C662A et α C665A ont été analysées par spectrométrie de masse électrospray. L'obtention de spectres exploitables a nécessité l'échange préalable du tampon Tris des préparations de mutants par du tampon carbonate de sodium afin de limiter la précipitation immédiate des protéines dans le tampon acide utilisé lors de l'analyse. Les spectres de la protéine α sauvage intacte et des quatre mutants sont rassemblés sur les figures D.4 et D.5.

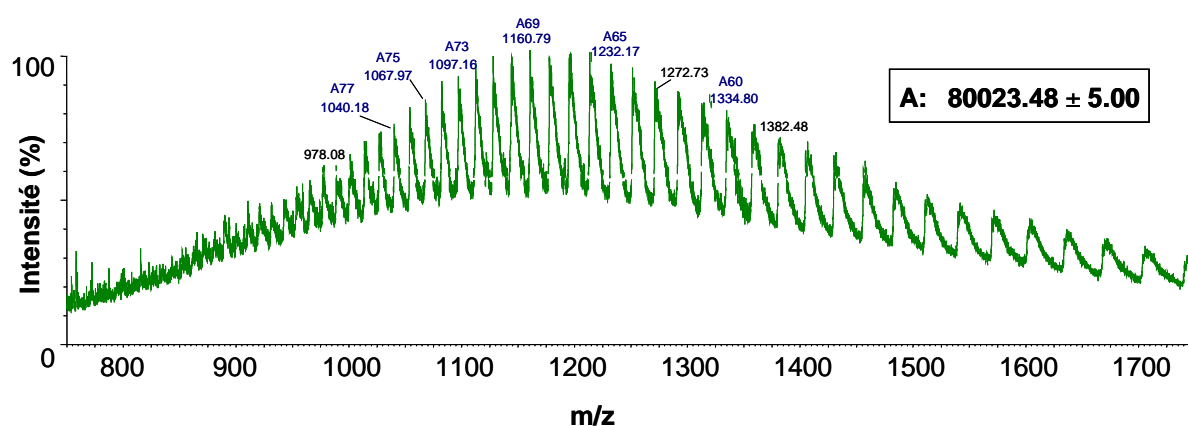


Figure D.4 - Spectre de masse électrospray brut obtenu en conditions dénaturantes de la protéine α intacte. La masse calculée de la protéine est indiquée sur le spectre.

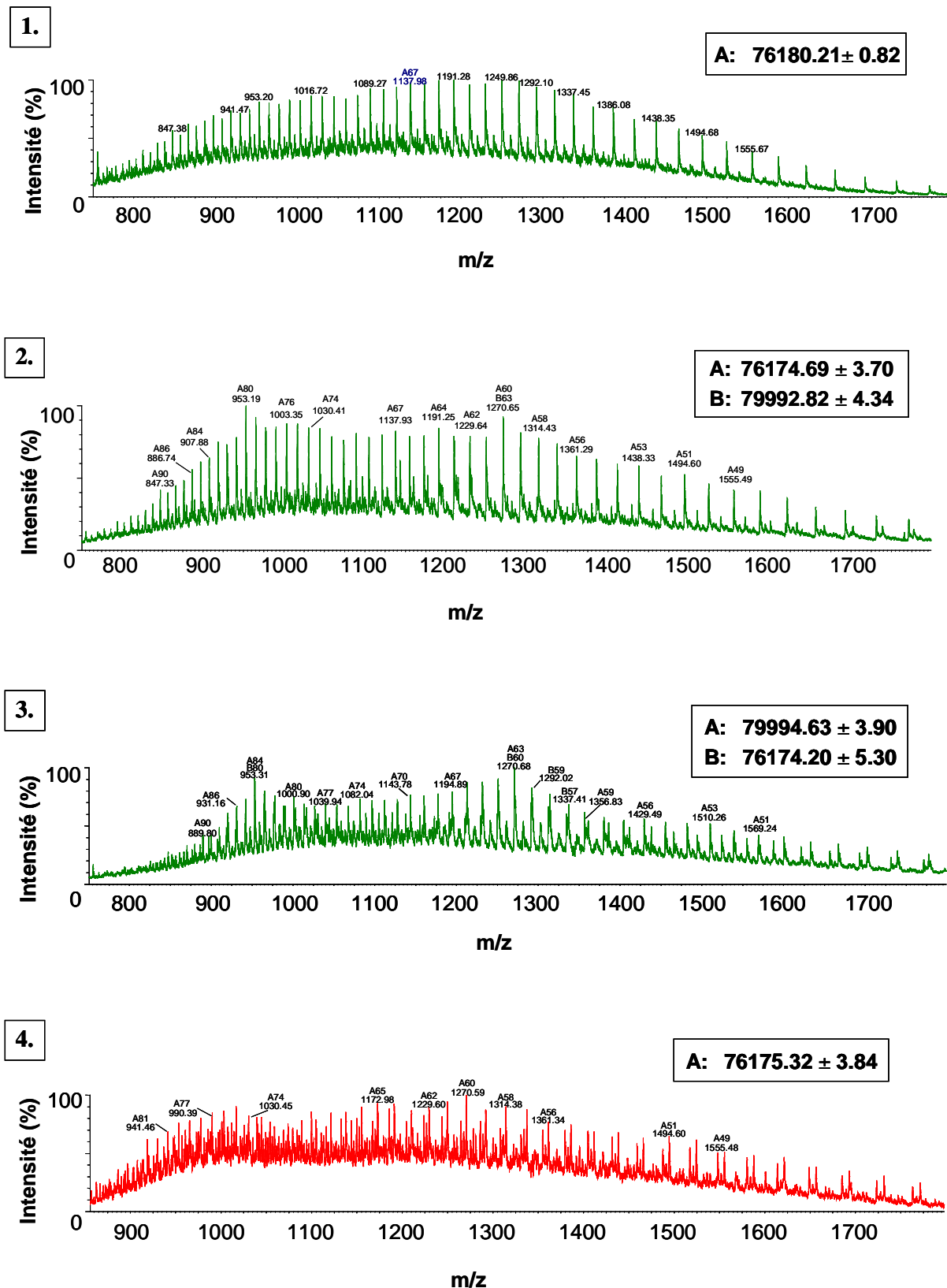


Figure D.5 - Spectres de masse électrospray bruts obtenus en conditions dénaturantes des protéines α C644A (1.), α C647A (2.), α C662A (3.) et α C665A (4.). Les masses calculées de l'espèce A (majoritaire) et le cas échéant de l'espèce B (minoritaire) sont indiquées sur chaque spectre.

Les spectres de masse bruts font apparaître l'enveloppe formée par la distribution des pics correspondant aux états multichargés $[M+nH]^{n+}$ où M représente la protéine monomérique intacte ou tronquée. La déconvolution des spectres permet d'accéder aux valeurs de masses moléculaires des différentes protéines. La masse calculée de la protéine α sauvage intacte est en accord avec la masse théorique (80023 Da). Les masses de l'espèce intacte présente dans les préparations de protéines α C647A et α C662A correspondent à la masse attendue pour la substitution d'une cystéine par une alanine (79991 Da). Les masses des formes tronquées présentes dans les préparations des quatre mutants sont très proches. La masse moyenne calculée, égale à 76176 Da, est compatible avec une coupure de la chaîne polypeptidique entre deux arginines adjacentes, Arg677 et Arg678, situées dans la partie C-terminale juste en amont de la glycine 681 (site radicalaire) et en aval des cystéines du site à zinc comme le montre la figure D.6. L'intégrité de la séquence N-terminale des mutants a été vérifiée par séquençage. Le site de coupure est identique pour les quatre mutants du site métallique étant donné le faible écart entre les valeurs de masse (c'est-à-dire 10% de la masse moyenne d'un acide aminé au maximum). La comparaison des masses des mutants et de la protéine sauvage tronquée obtenues par spectrométrie MALDI-TOF ainsi que le séquençage N-terminal de la protéine « apo α » indiquent que la coupure de la chaîne polypeptidique de la protéine α sauvage s'effectue très probablement au même endroit.

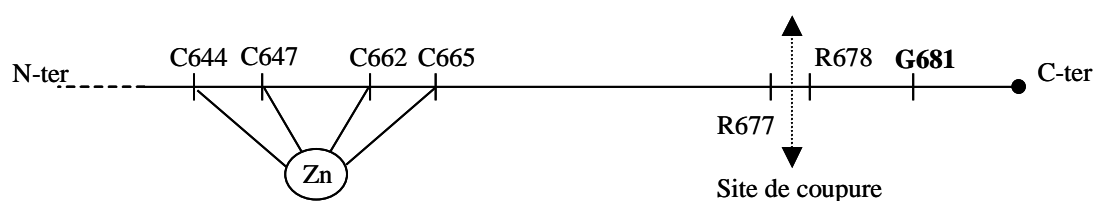


Figure D.6 - Localisation du site de coupure de la protéine α . D'après les études de spectrométrie de masse électrospray la protéolyse de la chaîne polypeptidique s'effectue entre les acides aminés Arg677 et Arg678.

D.I.3 - Influence du zinc sur la structure de la protéine α

Les résultats précédents laissent entrevoir l'existence d'une relation entre contenu en zinc et intégrité structurale des réductases. En effet la protéine « apo α », obtenue dans des conditions de carence en zinc, est presque exclusivement obtenue sous une forme tronquée. Les protéines α C644A, α C647A, α C662A et α C665A, dont les propriétés de fixation du zinc sont modifiées par la mutation, présentent quant à elles un taux variable de coupure. Dans le but de tester cette hypothèse, le contenu en zinc des différentes réductases a été déterminé puis rapporté au pourcentage de coupure évalué d'après les spectres de masse correspondants. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau D.4.

Protéine	Zn / α	Taux de coupure approximatif (%)
α sauvage	0,85	2
« apo α »	0,1	98
Mutants Cys→Ala du site métallique	0 - 0,2	40 - 95

Tableau D.4 - Contenu en zinc et taux de coupure de différents types de réductases. Les taux de coupure des protéines ont été déterminés à partir des spectres de masse correspondants (figures D.1 et D.3).

Les chiffres reportés dans le tableau D.4 confirment clairement l'existence d'un lien entre contenu en zinc et intégrité structurale des protéines. En effet la protéine α sauvage contenant près d'un atome de zinc par monomère est quasiment intacte ; à l'inverse la protéine « apo α », presque entièrement démétaillée, est tronquée à 98%. Les quatre mutants du site métallique, tous très déficients en zinc, présentent des taux de coupure élevés. Le zinc apparaît donc comme un cofacteur essentiel, garant de l'intégrité structurale de la protéine α . En particulier, le zinc offre vraisemblablement une protection contre la protéolyse menant à

l'élimination d'un fragment C-terminal fondamental pour l'activité RNR.

D.III - Site métallique et activité enzymatique : réexamen

Les premiers essais de corrélation entre contenu en zinc et activité enzymatique de la protéine α rapportés au paragraphe D.I.1 ont été réalisés avec des préparations dont l'homogénéité structurale n'était pas connue. La découverte de l'existence d'une forme tronquée inactive observable dans les préparations de protéines sauvages et mutées nous a incités à reconsidérer la question de l'influence du zinc sur l'activité dans ce nouveau contexte. L'étude a donc été reprise avec une attention particulière portée à la préparation et à la caractérisation structurale des protéines utilisées.

D.III.1 - Caractérisation des nouvelles préparations de protéine α

Les nouvelles préparations de protéine α sauvage ont été obtenues dans les conditions détaillées au paragraphe B.I. Le protocole de purification par chromatographie sur support hydrophobe a notamment été modifié et inclut désormais un gradient décroissant de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ comportant trois paliers. Dans la mesure du possible les délais entre les différentes étapes de purification ont été réduits au maximum. Les analyses de zinc systématiquement effectuées sur ces nouvelles préparations montrent que les protéines purifiées contiennent au minimum 0,75 atome de zinc par monomère. Les spectres de masse correspondants confirment l'intégrité structurale des polypeptides ; le taux de coupure approximatif est inférieur à 5% dans tous les cas. Les nouvelles préparations sont extrêmement actives : les activités spécifiques déterminées sont comprises entre 1000 et 1600 nmoles $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Ces valeurs sont significativement supérieures à celles obtenues avec les préparations de protéine α utilisées au cours des dix dernières années (200-300 nmoles $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ en moyenne). Tous ces éléments sont en faveur de l'importance du zinc pour la structure et l'activité de la protéine α . Nous avons cherché à obtenir une corrélation entre contenu en zinc et activité CTP réductase en utilisant notamment des préparations de protéines α partiellement démétallées par le TPEN. Dans le test d'activité RNR standard, réalisé en présence de DTT, la protéine α

utilisée à des concentrations comprises entre 0,25 et 1,25 μM peut aisément incorporer du zinc exogène apporté par les solutions ou le matériel (tubes en verre, seringue). Le test a donc été modifié afin de minimiser les contaminations en zinc. Toutes les étapes du test sont effectuées dans la boîte à gant en utilisant des tubes eppendorfs et du tampon chélexé. La concentration de la protéine α a été augmentée à 10-40 μM . En conséquence la durée de l'étape de réduction a été réduite de 20 minutes à 1-3 minutes de manière à éviter l'épuisement du substrat rapidement atteint avec les nouvelles préparations de protéine α , qui présentent une activité spécifique élevée. Le test devient difficile à réaliser dans ces conditions et sa mise en oeuvre conduit à des résultats non reproductibles. La corrélation recherchée entre contenu en zinc et activité CTP réductase de la protéine α n'a donc pu être obtenue.

D.III.2 - Etude des mutants αC644A et αC662A

Il est très possible que le phénomène de protéolyse mis en évidence ci-avant explique l'absence d'activité des mutants Cys \rightarrow Ala du site métallique de la protéine α observée lors des études antérieures. Si tel est le cas les conclusions issues de ces expériences ne sont pas valides. L'étude de l'importance du site à zinc pour l'activité enzymatique par le biais des mutants cystéines a donc nécessité la mise au point préalable des conditions d'expression et de purification des protéines de manière à s'affranchir de la présence de formes tronquées inactives. Nous avons décidé d'axer ce travail sur deux des quatre mutants, choisis de manière à tester l'effet de la mutation d'une cystéine de chacun des deux motifs CXXC du site métallique.

D.III.2.a - Préparation des protéines

Les protéines αC644A et αC662A ont été surexprimées en anaérobiose, dans du milieu riche LB complémenté avec 30 μM d'acétate de zinc. L'extraction est réalisée avec du tampon sans EDTA contenant 100 μM de $\text{Zn}(\text{OAc})_2$. Les protéines sont ensuite purifiées par chromatographie d'affinité dATP Sepharose après une étape de dialyse effectuée sur la nuit

contre du tampon enrichi en DTT (2 mM) et $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ (50 μM). Le dosage de zinc par colorimétrie montre que les deux mutants contiennent chacun près d'un atome de zinc par monomère spécifiquement lié au site métallique muté (métal inaccessible au PAR seul) ainsi que des quantités variables de zinc faiblement lié à la protéine (0,5 à 1 atome par monomère). La mutation d'une seule des cystéines en alanine ne signifie donc pas que le site métallique a perdu toute capacité à complexer le métal, notamment dans les conditions de pression en zinc imposées dans le cadre de cette étude. Les spectres de masse des 2 mutants sont présentés sur la figure D.7.

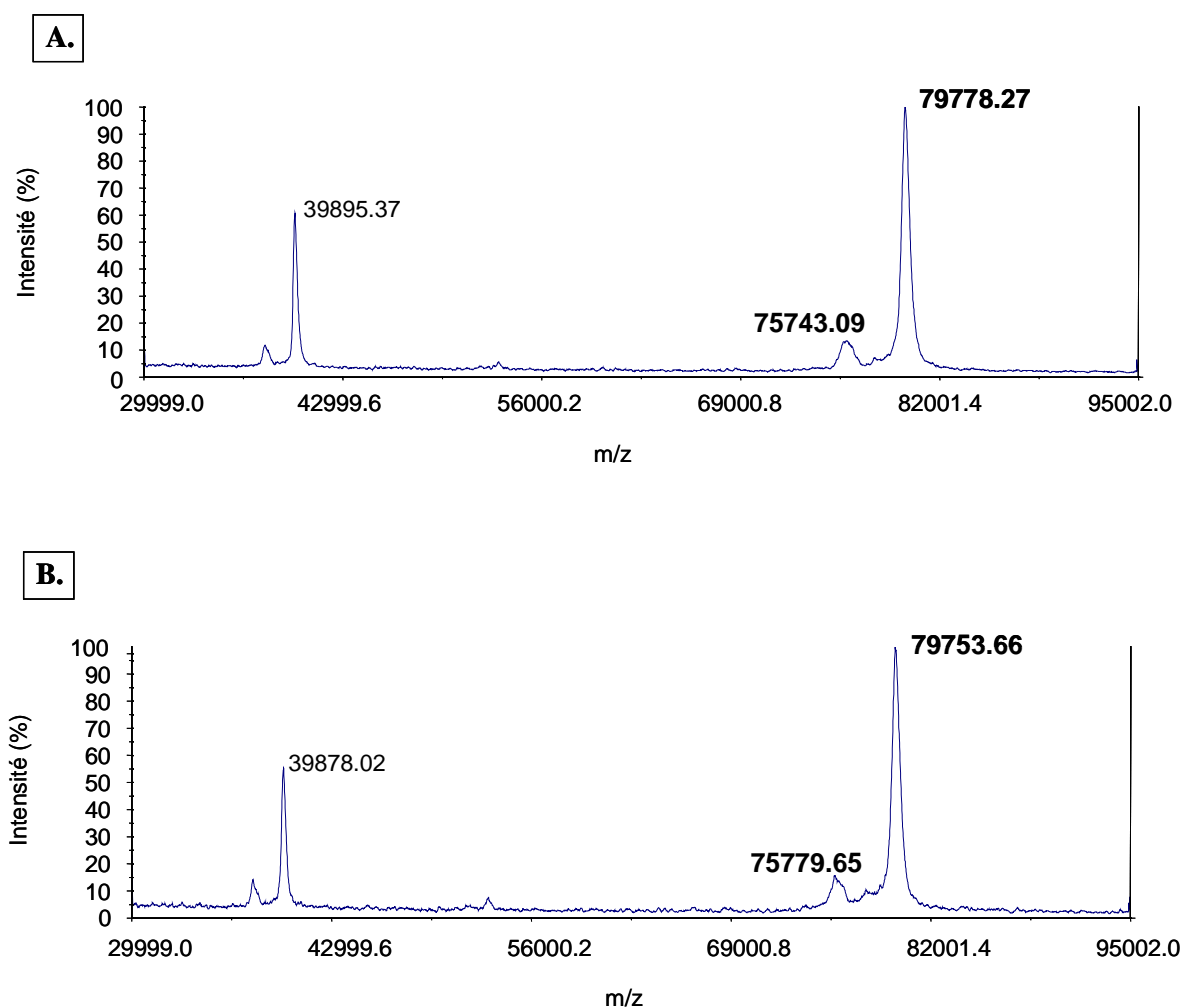


Figure D.7 - Spectres de masse MALDI-TOF des protéines αC644A (A.) et αC662A (B.) préparées dans des conditions d'enrichissement en zinc. Les pics dont les valeurs de m/z sont notées en gras correspondent aux espèces ioniques $[\text{M}+\text{H}]^+$ où M représente la molécule de protéine α monomérique intacte ou tronquée.

Il apparaît immédiatement que le profil de coupure de la figure D.7 est très différent de celui de la figure D.3 : les protéines α C644A et α C662A sont ici majoritairement intactes, avec des taux de coupure évalués respectivement à 12% et 15%. Ainsi l'incorporation supplémentaire de zinc que permet d'obtenir le protocole de préparation décrit plus haut va de pair avec le maintien de l'intégrité structurale des mutants, même si l'une des cystéines du site métallique est remplacée par une alanine. L'homogénéité structurale des protéines est jugée suffisante pour les études ultérieures, bien que les taux de coupure des deux mutants restent légèrement supérieurs à ceux des préparations de protéine α sauvage.

D.III.2.b – Activités CTP réductase

L'étude de l'activité RNR des mutants α C644A et α C662A a été reprise avec les nouvelles préparations caractérisées précédemment. Les activités CTP réductase des protéines α C644A, α C662A et α sauvage sont présentées dans le tableau D.5.

Protéine	Activité spécifique (nmoles min ⁻¹ mg ⁻¹)
α sauvage	1000
α C644A	< 1
α C662A	< 1

Tableau D.5 - Activités CTP réductase des protéines α C644A et α C662A intactes et métallées.

Les résultats obtenus montrent clairement que l'activité RNR des protéines α C644A et α C662A est négligeable devant celle de la protéine sauvage mesurée conjointement. Il semble donc que la présence de zinc dans le site métallique ne suffise pas à assurer l'activité CTP réductase des deux mutants, même si elle garantit la préservation de la structure primaire des polypeptides. Les quatre cystéines du site métallique doivent être présentes, probablement

pour que la fixation du zinc se traduise par la stabilisation d'une conformation optimisée pour l'activité RNR. Il est probable que remplacement de l'une des cystéines par une alanine modifie sensiblement cette conformation, de telle sorte que les mutants correspondants sont complètement inactifs.

D.IV - Zinc et interaction α - β

Le site $\text{Zn}(\text{Cys})_4$ nécessaire au maintien de l'intégrité structurale de la protéine α forme un petit domaine individualisé qui pourrait participer à la formation du complexe entre la réductase et l'activase. L'effet du zinc sur la complexation entre les protéines α et β a été étudié par chromatographie d'affinité dATP Sepharose et par chromatographie de filtration sur gel en utilisant une protéine α préalablement démétaillée par le TPEN.

D.IV.1 - Etude par chromatographie d'affinité dATP Sepharose

La résine d'affinité dATP Sepharose fixe spécifiquement la protéine α mais retient également le complexe formé par les protéines α et β fortement associées. Les expériences de complexation ont été menées en boîte à gants avec une préparation de protéine β reconstituée, c'est-à-dire contenant en moyenne un centre $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ par polypeptide. Les protéines α et β sont mélangées dans un rapport 1,4:1 dans du tampon chélexé en présence de 5 mM de DTT puis la solution est déposée sur la résine d'affinité. Après une étape de lavage avec 3 volumes de colonne de tampon l'élution est réalisée avec une solution d'ATP 1 mM. Le gel SDS-PAGE obtenu est présenté sur la figure D.8.

Indépendamment du contenu en zinc de la protéine α une partie des protéines α et β est éliminée dans la fraction de lavage et n'est donc pas retenue sur la résine. La protéine β est visible sur la piste 4 : l'élimination de 80% du zinc de la protéine α n'empêche pas la protéine β de former un complexe avec la réductase. La stœchiométrie du complexe entre la protéine α et la protéine β peut être évaluée à partir de la mesure de l'intensité relative des bandes correspondantes (pistes 2 et 4) et des valeurs des masses moléculaires de la réductase et de

l'activase. Il apparaît que les protéines α métallée et démétallée forment de la même façon un complexe 1:1 avec la protéine β .

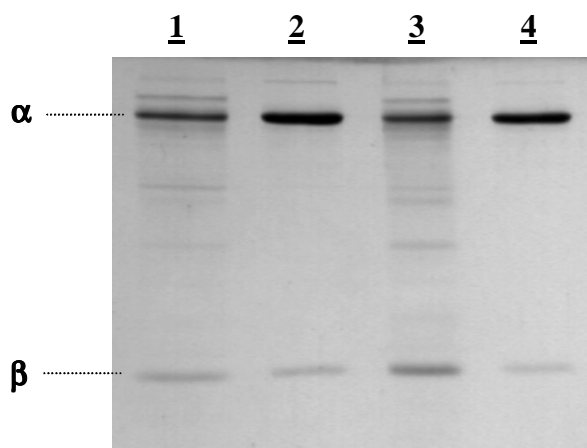


Figure D.8 – Analyse SDS-PAGE de l'effet du zinc sur la complexation entre les protéines α et β étudié par chromatographie d'affinité dATP Sepharose. La protéine α métallée (0,8 Zn/ α , 10 nmoles) ou α traitée au TPEN (0,15 Zn/ α , 10 nmoles) a été mélangée avec la protéine β reconstituée (7 nmoles) dans la boîte à gants dans du tampon Tris-HCl 100 mM pH 8, KCl 300 mM chélexé. La solution obtenue (3 mg /mL) a été chargée sur la colonne de dATP Sepharose (1 mL) à un débit de 0,2 mL/min. La résine a été lavée avec 8 volumes du tampon précédent (1, 3) puis l'élution a été effectuée avec 1 mM d'ATP (2, 4). Les puits 1, 2 d'une part, 3, 4 d'autre part correspondent respectivement aux expériences réalisées avec la protéine α métallée et avec la protéine α démétallée.

D.IV.2 - Etude par chromatographie de filtration sur gel

L'effet du zinc sur la complexation entre les protéines α et β a également été étudié par chromatographie de filtration sur gel Superdex 200. Les préparations de protéines α sont celles utilisées pour l'expérience de complexation précédente. La protéine β sous forme apo a ici été utilisée en raison de l'instabilité du centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ en aérobiose. Les chromatogrammes obtenus sont présentés sur la figure D.9.

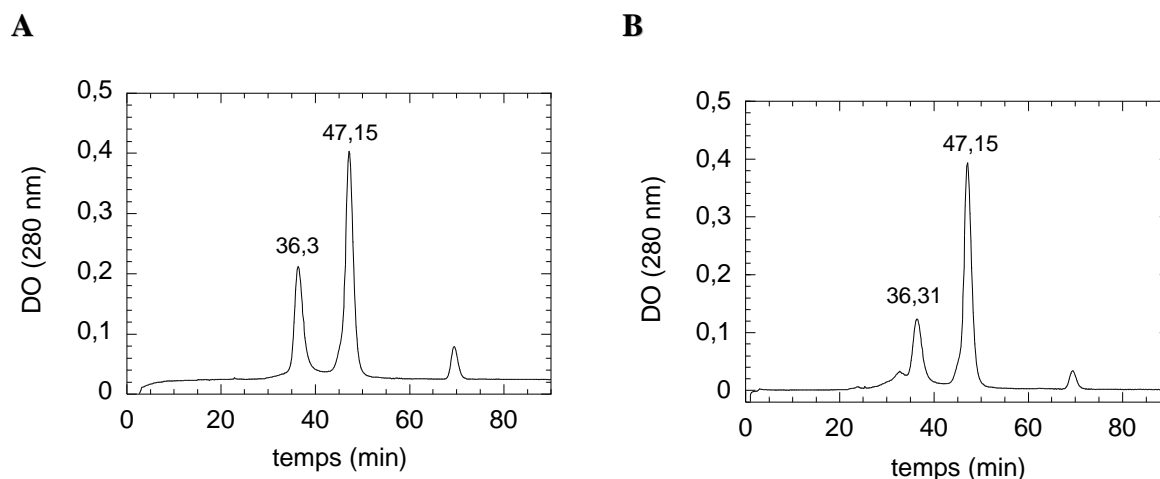


Figure D.9 – Effet du zinc sur la complexation entre les protéines α et β : étude par chromatographie de filtration sur gel. La protéine α métallée (0,8 Zn/ α , 10 nmoles) ou α traitée au TPEN (0,15 Zn/ α , 10 nmoles) a été mélangée avec la protéine β reconstituée (50 nmoles) dans du tampon HEPES 50 mM pH 7,4, KCl 50 mM chélexé avec 5 mM de DTT. La solution obtenue a été injectée sur une colonne SDX 200 analytique (25 mL) à un débit de 0,4 mL/min. Les chromatogrammes A et B correspondent respectivement aux expériences réalisées avec la protéine α métallée et avec la protéine α démétallée.

La fraction éluée à 36,3 min contient la protéine α seule ou éventuellement un complexe entre les protéines α et β . Le contenu de cette fraction a ensuite été analysé par électrophorèse en conditions dénaturantes. Le gel obtenu est présenté sur la figure D.10.

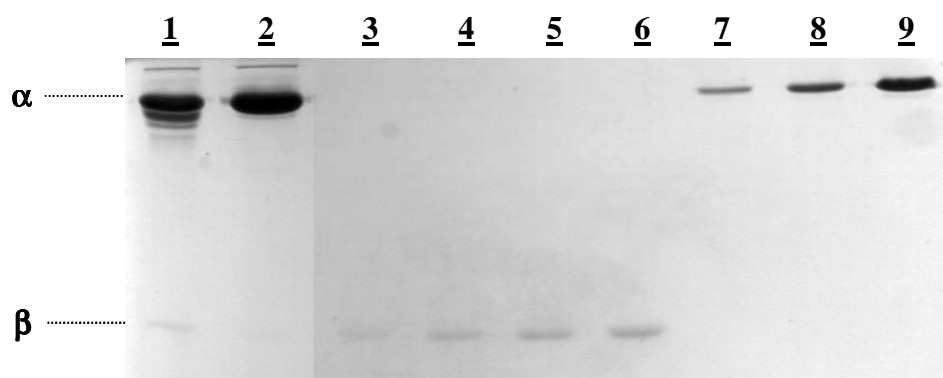


Figure D.10 - Analyse SDS-PAGE de l'effet du zinc sur la complexation entre les protéines α et β étudié par chromatographie de filtration sur gel SDX 200. Des aliquots des fractions éluées à 36 min lors de la chromatographie de filtration sur gel avec la protéine α métallée et avec la protéine α démétallée (figure D.9) sont respectivement déposés dans les puits 1 et 2. Les puits 3 à 6 contiennent des quantités croissantes de protéine apo β purifiée ; les puits 7 à 9 contiennent des quantités croissantes de protéine α métallée purifiée.

Sur le gel de la figure D.10, une bande vers 20 kDa correspondant à la protéine β apparaît sur la piste 1 mais n'est pas visible sur la piste 2. Des gammes étalons permettant la quantification des protéines α et β ont été obtenues en déposant des quantités croissantes des deux protéines sur le même gel (pistes 3 à 6 et 7 à 9). D'après ces gammes le rapport des quantités de protéine α métallée et de protéine β est égal à 1:0,6. Le complexe 1:1 entre les protéines α et β est donc partiellement dissocié au cours de l'élution. L'utilisation d'un excès de protéine β par rapport à la protéine α est d'ailleurs nécessaire à la détection d'un complexe par électrophorèse. Il semble que les protéines α démétallée et β ne forment pas de complexe résistant à la chromatographie dans les conditions utilisées.

E – Discussion

La structure cristallographique de la ribonucléotide réductase anaérobie du bactériophage T4 (Logan 2003) a révélé la présence d'un site métallique dans la partie C-terminale de la protéine. D'après l'analyse des cristaux, les quatre cystéines conservées qui construisent le site fixent majoritairement du zinc. Des traces de fer ont également été détectées. Le premier objectif de ce travail a consisté à identifier le métal lié à la ribonucléotide réductase anaérobie d'*Escherichia coli*. Les différents dosages de métaux réalisés ont montré que l'expression homologue de la protéine α d'*E. coli* s'accompagne d'une incorporation de zinc dans le site métallique. Des quantités négligeables de fer ont également été mesurées. Ce résultat préliminaire permet d'éliminer l'hypothèse selon laquelle le site métallique serait impliqué dans une réaction de transfert d'électrons. La question du rôle du site métallique nécessite dès lors d'examiner d'autres hypothèses compatibles avec la nature du métal lié à la protéine α .

E.I – Préambule bibliographique

Ce paragraphe présente une vue d'ensemble des caractéristiques générales des différents types de sites à zinc telles qu'elles apparaissent dans la littérature.

Dans les protéines à zinc, l'ion Zn^{2+} joue généralement un rôle catalytique, cocatalytique ou structural. Dans un site à zinc catalytique, le métal intervient directement dans le mécanisme catalytique en participant à la formation ou à la rupture de liaisons chimiques. Le zinc fait donc partie du site actif de l'enzyme et interagit avec le substrat de la réaction. Dans un site à zinc cocatalytique, deux ou plusieurs ions métalliques proches spatialement coopèrent ; l'un joue un rôle catalytique et l'autre (les autres) augmente(nt) l'activité catalytique du site. Enfin dans un site à zinc structural l'ion Zn^{2+} stabilise principalement la structure tertiaire de l'enzyme comme peuvent le faire les ponts disulfures. Dans tous les cas, l'élimination du zinc de la protéine peut conduire à la perte de l'activité enzymatique. Une analyse systématique de la structure et de la fonction d'un certain nombre de protéines à zinc a permis de dégager quelques traits caractéristiques des sites à zinc catalytique d'une part, structural d'autre part (Vallee 1990b). Ce type de compilation est une base utile pour l'étude préliminaire de métalloprotéines à zinc dont le rôle n'est pas encore connu.

Une caractéristique spécifique des sites à zinc catalytique est l'existence d'une sphère de coordination ouverte : la sphère de coordination du zinc contient au moins une molécule d'eau en plus des trois ou quatre ligands apportés par la protéine. Une telle situation permet de diagnostiquer de façon certaine la présence d'un site à zinc catalytique. La molécule d'eau liée au zinc est un composant essentiel du site actif ; elle peut s'ioniser en un ion hydroxyde (exemple de l'anhydrase carbonique), être polarisée par une base pour produire une entité nucléophile nécessaire à la catalyse (exemple de la carboxypeptidase A) ou encore être déplacée par une molécule de substrat (exemple de la phosphatase alcaline) (Vallee 1990a). Dans les sites à zinc catalytique l'histidine est le ligand le plus fréquemment observé. Les ligands aspartates, glutamates et cystéines sont également utilisés pour lier le métal. En général l'ion Zn^{2+} est engagé dans des liaisons de coordination avec les chaînes latérales de trois acides aminés, une molécule d'eau complétant la sphère de coordination tétraédrique. Cependant un quatrième acide aminé participe parfois à la fixation du zinc, conduisant à une géométrie de type bipyramide trigonale (Wilson 1993 ; Gomis-Ruth 1993).

Dans les sites à zinc cocatalytique, le zinc catalytique lie une molécule d'eau nécessaire à la catalyse et possède une sphère de coordination similaire à celle observée dans les enzymes à zinc catalytique unique. Cependant le deuxième atome de zinc et éventuellement le troisième métal (Zn ou Mg) sont parfois entourés de ligands atypiques tels que l'atome d'oxygène d'une sérine ou d'une thréonine ou encore l'atome d'azote du groupe amino C-terminal de la protéine. Une autre caractéristique est la présence d'au moins un ligand pontant (aspartate, H_2O) entre le deuxième ion Zn^{2+} et le troisième métal, ce qui conduit souvent à une géométrie pentacoordinée. Ce groupe d'enzymes inclut la nucléase P1 et la leucine aminopeptidase (deux ions Zn^{2+}), la phospholipase C (trois ions Zn^{2+}) et la phosphatase alcaline (deux ions Zn^{2+} et un ion Mg^{2+}) (Vallee 1993).

Dans les sites à zinc structural, l'ion métallique est coordonné par les chaînes latérales de quatre acides aminés, généralement avec une géométrie tétraédrique, de sorte que le solvant ne peut constituer un ligand de sphère interne. La cystéine est de loin le ligand le plus fréquemment utilisé dans ce type de sites ; l'histidine est également présente dans de nombreuses protéines. Les ligands aspartates et glutamates apparaissent beaucoup plus rarement. Contrairement aux sites catalytiques, les sites à zinc structural ne comportent pas de motif caractéristique en terme de longueur des séquences d'acides aminés séparant les ligands du métal. De plus les ligands n'appartiennent pas nécessairement à une structure secondaire rigide mais peuvent faire partie d'une boucle flexible. Le groupe ubiquitaire des protéines à doigt de zinc illustre la manière dont le zinc structure un domaine, au sein duquel il établit des pontages entre éléments de structure secondaire. Le terme « doigt de zinc » était à l'origine utilisé pour définir un motif répété fixant du zinc présent dans le facteur de transcription IIIA de *Xenopus* et capable de reconnaître des séquences spécifiques d'ADN (Miller 1985 ; Hanas 1983). L'expression est maintenant largement utilisée pour décrire tout domaine compact dont la structure est stabilisée par la liaison d'un ou plusieurs ion(s) Zn^{2+} (Klug 1995). Les sphères de coordination principales des protéines à doigt de zinc sont du type Cys_2His_2 , Cys_3His ou Cys_4 , avec de nombreuses permutations possibles dans l'ordre des ligands. Ces motifs à quatre acides aminés sont parfois dupliqués, ce qui permet la fixation de deux ions Zn^{2+} par

chaîne polypeptidique. De plus la liaison du métal ne s'effectue pas nécessairement dans l'ordre selon lequel les ligands apparaissent dans la séquence primaire de la protéine. Les domaines à doigt de zinc ont été regroupés d'après des considérations de type, de nombre et d'espacement des ligands du métal. Il existe actuellement au moins quatorze classes de domaines à doigt de zinc bien caractérisées (Matthews 2002). La grande variabilité structurale de ces modules leur permet d'assurer des fonctions très diverses, quelquefois non encore précisées. De manière générale, les domaines à doigt de zinc partagent l'aptitude à interagir avec d'autres biomolécules (ADN, ARN, lipides ou protéines).

Les caractéristiques des sites à zinc catalytique, cocatalytique et structural sont résumées dans le tableau E.1.

	Zn cocatalytique			
	Zn catalytique	Zn catalytique	Zn non catalytique	Zn structural
Sphère de coordination	Ouverte	Ouverte	Fermée ou avec H ₂ O pontante	Fermée
Ligands (type) ¹	His , Asp, Glu, Cys, H₂O	His , Asp, Glu, H₂O	His , Asp , Ser, N/O, H ₂ O	Cys , His (Asp, Glu)
Ligands (nombre)	4 ou 5	4 ou 5	5	4
Géométrie autour du métal	Asymétrique (tétraèdre ou BT ² irréguliers)	Tétraèdre ou BT irréguliers	BT légèrement irrégulière ³	Symétrique (tétraèdre)
Localisation des ligands	Rigide (hélice α ou brin β)	Non rigide (boucle, hélice α ou brin β)		Non rigide (boucle, hélice α ou brin β)
Espacement entre ligands	Régulier	Régulier	Irrégulier	Irrégulier

Tableau E.1 - Caractéristiques générales de l'environnement du métal dans les sites à zinc catalytique, cocatalytique et structural. ¹ Les ligands les plus communément observés sont en gras ; ² Bipyramide Trigonale ; ³ Géométrie octaédrique si l'ion est Mg²⁺. D'après McCall 2000.

Il faut préciser que les propriétés rappelées dans le tableau E.1 reflètent une tendance générale ; l'identification d'un site à zinc comme centre catalytique ou structural d'après les paramètres énoncés précédemment n'est pas toujours aussi directe qu'il y paraît. Deux exemples de la littérature illustrent les singularités que peuvent présenter certains sites à zinc.

La protéine Ada d'*Escherichia coli* répare le diastéréoisomère S_p des méthylphosphotriesters de l'ADN (McCarthy 1985). Elle possède un site à zinc présentant les caractéristiques d'un site structural : les quatre cystéines chélatant le métal ne laissent aucun site de sphère interne disponible pour la fixation du substrat. Le site est en effet important pour la stabilisation de la structure tertiaire de la protéine (Myers 1992). Le zinc a également pour fonction d'activer la nucléophilie d'un des ligands thiolates qui participe alors directement à la réparation de l'ADN méthylé (Myers 1993). Ainsi les sites à zinc précédemment identifiés comme sites structuraux peuvent éventuellement jouer d'autres rôles ; toutefois les sites comportant quatre cystéines jouent un rôle purement structural dans la très grande majorité des cas.

Les aminoacyl-ARNt synthétases fixent l'ATP et sélectionnent l'acide aminé apparenté pour former un intermédiaire aminoacyl-adénylate. L'acide aminé est ensuite transféré sur l'adénosine 3'-terminale de l'ARNt. La thréonyl-ARNt synthétase possède un atome de zinc lié de manière tétraédrique par deux histidines, une cystéine et une molécule d'eau. La fixation du substrat conduit à un intermédiaire pentacoordiné avec une géométrie de type pyramide à base carrée dans lequel le groupe amino et le groupe hydroxyle de la thréonine déplacent la molécule d'eau et coordinent l'ion Zn^{2+} (Sankaranarayanan 2000). L'environnement du métal assure ainsi l'activation des seuls acides aminés possédant un groupe hydroxyle en position β . Dans cet exemple le zinc n'est donc ni strictement catalytique, ni structural, mais se comporte plutôt comme un cofacteur indispensable pour l'étape de reconnaissance du substrat.

E.II - Zinc et intégrité structurale de la protéine α

La ribonucléotide réductase anaérobie d'*E. coli* contient un atome de zinc par monomère lié de manière tétraédrique par quatre cystéines conservées. Les deux motifs CXXC contenant les ligands du métal se situent sur des boucles. Le site métallique constitue l'extrémité d'un bras qui s'étend à l'extérieur du domaine compact en tonneau au cœur duquel se trouve le site actif. Ainsi d'après la structure cristallographique de l'enzyme la distance entre l'atome de zinc et le carbone α de l'alanine 580 est de 25 Å. Ces propriétés suggèrent fortement que le zinc joue un rôle structural en organisant un petit domaine individualisé dans la région C-terminale de l'enzyme. Le site à zinc de la RNR anaérobie d'*E. coli* présente d'ailleurs des homologues structurales avec les sites métalliques de diverses protéines à doigt de zinc. Krishna *et al.* ont réalisé une analyse détaillée des domaines à doigt de zinc. Plus précisément, ils ont étudié l'organisation des éléments de structure secondaire autour du métal (Krishna 2003). Selon la classification proposée les protéines homologues de la RNR appartiennent toutes au groupe appelé « ruban à zinc ». La structure canonique du site métallique de ce groupe est composée de deux épingles à cheveux β contenant chacune un motif de type CXXC qui apporte les ligands du zinc ; deux sous-sites de structures similaires participent donc à la fixation du zinc. Certains homologues de la RNR comme le facteur de transcription IIB font partie de la famille « ruban à zinc classique », qui regroupe principalement des protéines impliquées dans la machinerie de transcription et de traduction (facteurs de transcription, primases, ARN polymérases, topoisomérases et protéines ribosomales). D'autres homologues appartiennent à la famille des rubrédoxines (exemple des rubrérythrines à fer ou à zinc) ou à celle des protéines à domaine de type rubrédoxine (exemple de la valyl-tRNA synthétase). Dans cette dernière famille, le site à zinc fait généralement partie d'un module d'interaction ; il organise par exemple un domaine flexible qui couvre ou découvre le site actif de l'adénylate kinase des bactéries gram négatives à la manière d'un couvercle (Berry 1998).

La découverte d'un phénomène de protéolyse affectant les réductases dépourvues de zinc a révélé l'importance du métal pour l'intégrité structurale de la RNR. La préparation des

mutants C644A et C662A dans des conditions d'enrichissement en zinc suffit à leur apporter une protection contre la protéolyse à laquelle ils sont particulièrement sensibles si une pression de zinc n'est pas maintenue. La coupure de la chaîne polypeptidique s'effectue entre deux arginines adjacentes situées juste après le dernier brin β constituant le site métallique. Elle libère un petit fragment C-terminal qui contient notamment la boucle portant la glycine 681 essentielle pour l'activité enzymatique. La flexibilité de la boucle C-terminale est particulièrement visible dans les structures cristallographiques de plusieurs mutants de la RNR anaérobie du BT4 possédant la glycine 681 native (DT Logan, communication personnelle). Il est probable qu'en absence de zinc cette région normalement enfouie soit faiblement structurée et devienne accessible aux agents de coupure extérieurs. L'existence d'un couplage entre repliement d'une protéine à zinc et fixation du métal a été démontrée au cours de l'étude des protéines à doigt de zinc (Cox 2000). Ainsi un peptide synthétique correspondant à un domaine en doigt de zinc du facteur de transcription IIIA se structure spontanément en présence de zinc, comme le montre la modification appréciable du spectre de dichroïsme circulaire provoquée par l'ajout de ZnCl_2 à la forme apo du peptide (Frankel 1987). Les domaines à doigt de zinc ont la capacité de se replier indépendamment du reste de la chaîne polypeptidique ; lorsque la taille de la protéine augmente, des interactions supplémentaires externes au site métallique sont parfois requises. Les formes démétallées des protéines à zinc structural présentent très souvent une sensibilité marquée vis-à-vis de la protéolyse. Les protéines g32P, RsrA, Hsp33 et la thiorédoxine 2 possèdent un site à zinc tétraédrique ; les apoprotéines correspondantes ont été préparées puis soumises à des expériences de trypsinolyse limitée. Dans tous les cas le zinc apporte à ces protéines une protection majeure contre la protéolyse (Giedroc 1986 ; Bae 2004 ; Jakob 2000 ; Collet 2003). La stabilisation de la structure d'une métalloprotéine est d'autant plus importante que le métal est lié avec une affinité élevée (Arnold 1994). Cette caractéristique est vérifiée dans le cas de la protéine α ; en effet la constante d'association apparente du zinc à la protéine a été estimée à $5 \times 10^{17} \text{ M}^{-1}$ à pH 8 et 4°C. Cette valeur est comparable à celles obtenues pour d'autres protéines contenant un site à zinc lié par plusieurs cystéines. Ainsi la thiorédoxine 2 fixe un atome de zinc dans son site formé de deux motifs CXXC avec une affinité très élevée ($K_a >$

10^{18} M^{-1} à pH 7,5 et 23°C) (Collet 2003). De même, les constantes d'association du zinc aux protéines Hsp33 et RsrA, dont le site métallique comporte respectivement quatre et trois cystéines, sont égales à $2,5 \times 10^{17} \text{ M}^{-1}$ (à pH 7,5 et 23°C) et $1,0 \times 10^{17} \text{ M}^{-1}$ (à pH 7,6 et 23°C) (Jakob 2000 ; Bae 2004). L'importance du zinc pour la structure de la RNR anaérobie est confirmée par l'observation de l'instabilité de la forme apo des réductases. Les divers traitements utilisés pour préparer l'apoprotéine (chélateurs, réactifs électrophiles) provoquent la précipitation plus ou moins importante mais systématique de la réductase ; de même la réductase sauvage protéolysée (protéine « apo α ») ainsi que les mutants du site à zinc démétallés précipitent dans le tampon acide utilisé pour les expériences de spectrométrie de masse, alors que les protéines intactes et métallées correspondantes sont relativement stables dans les mêmes conditions.

S'il est bien connu que les domaines à doigt de zinc constituent des modules de reconnaissance de séquences d'ADN, il devient également apparent que ces structures sont parfois impliquées dans des interactions entre protéines. Les sites à zinc peuvent ainsi favoriser la multimérisation de protéines identiques ou l'association entre une protéine et divers facteurs (coactivateurs, corépresseurs...) intervenant dans le contrôle transcriptionnel d'un groupe de gènes (Leon 2000). Dans le cas de la RNR anaérobie d'*E. coli*, la démétallation de la protéine α n'empêche pas la formation d'un complexe 1:1 entre la protéine α et la protéine β . Même si dans certaines conditions le complexe formé avec la protéine α démétallée est moins stable que celui formé avec la protéine α métallée, les expériences réalisées montrent qualitativement que le site $\text{Zn}(\text{Cys})_4$ n'exerce pas d'influence majeure sur la complexation entre la réductase et l'activase. Certains sites à zinc structuraux comportant des cystéines sont sensibles aux espèces activées de l'oxygène. Ces dernières provoquent la formation d'un pont disulfure dans le site métallique, conduisant à la libération du zinc et à un changement de conformation de la protéine, dont l'activité est altérée. Aucune labilisation du zinc n'a été observée lors des essais d'oxydation de la protéine α en présence d' H_2O_2 . Le site $\text{Zn}(\text{Cys})_4$ de la protéine α ne semble donc pas *a priori* destiné à induire une réponse au stress oxydant. Ainsi les résultats obtenus suggèrent que le site à zinc de la

protéine α d'*E. coli* joue un rôle purement structural en organisant l'extrémité C-terminale de l'enzyme.

E.III - Zinc et activité enzymatique de la protéine α

Les études précédentes réalisées avec les mutants Cys→Ala du site métallique de la RNR anaérobie d'*E. coli* et les mutants Cys→Ser de la protéine homologue du bactériophage T4 ont montré que toutes ces protéines sont incapables d'acquérir le radical glycinyle nécessaire à l'activité RNR (Logan 2003, Andersson 2000). La structure cristallographique de l'enzyme du BT4 a d'autre part révélé la présence de zinc et de traces de fer dans le site tétrathiolate. Plusieurs hypothèses tenant compte de la nature du métal ont été proposées pour répondre à la question de la participation du site métallique à l'activation de la RNR. Cependant la mise en évidence au cours de ce travail d'une forme tronquée des réductases d'*E. coli* nous a incités à reconsidérer les résultats de l'étude par mutagenèse dirigée. En effet les mutants du site $\text{Zn}(\text{Cys})_4$ sont susceptibles de perdre du zinc au cours des étapes de purification et donc de subir une protéolyse. L'absence de formation du radical glycinyle pourrait donc simplement s'expliquer par la perte de la portion C-terminale contenant la glycine 681, du moins dans le cas des mutants de la RNR d'*E. coli*. L'étude du rôle du site métallique a donc nécessité un réexamen préalable du mode d'obtention des différentes réductases sauvage et mutées.

La modification du protocole suivi lors de la purification de la réductase sauvage par chromatographie sur support hydrophobe a permis d'isoler des préparations homogènes de protéine α , non protéolysées et contenant au minimum 0,75 zinc par monomère. La quantité de zinc dans le milieu LB ainsi que l'affinité du site tétrathiolate pour le métal sont suffisamment élevées pour que la supplémentation en zinc du milieu de culture ne soit pas nécessaire au maintien de l'intégrité structurale de la protéine α . Les protéines α purifiées selon le nouveau protocole présentent des activités CTP réductase très élevées, jamais atteintes au laboratoire auparavant ($1300 \text{ nmoles min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ en moyenne) et toujours

supérieures à $1000 \text{ nmoles min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. L'activité spécifique des anciennes préparations était non seulement plus faible ($300 \text{ nmoles min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ en moyenne), mais également très variable entre les préparations : alors que certaines d'entre elles présentaient des activités de $800 \text{ nmoles min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, d'autres étaient quasiment inactives. Il est possible que la modification du gradient de la chromatographie sur support hydrophobe permette l'élimination d'une population de protéines α inactives (figure B.2, pic D) qui était présente dans les préparations issues du précédent protocole (figure B.1, pic B). Il est clair en tout cas que la présence d'un mélange de formes de la protéine α dans les anciennes préparations est légitimement envisageable compte tenu du phénomène de protéolyse affectant les enzymes démetallées. La figure E.1 représente ces différentes formes.

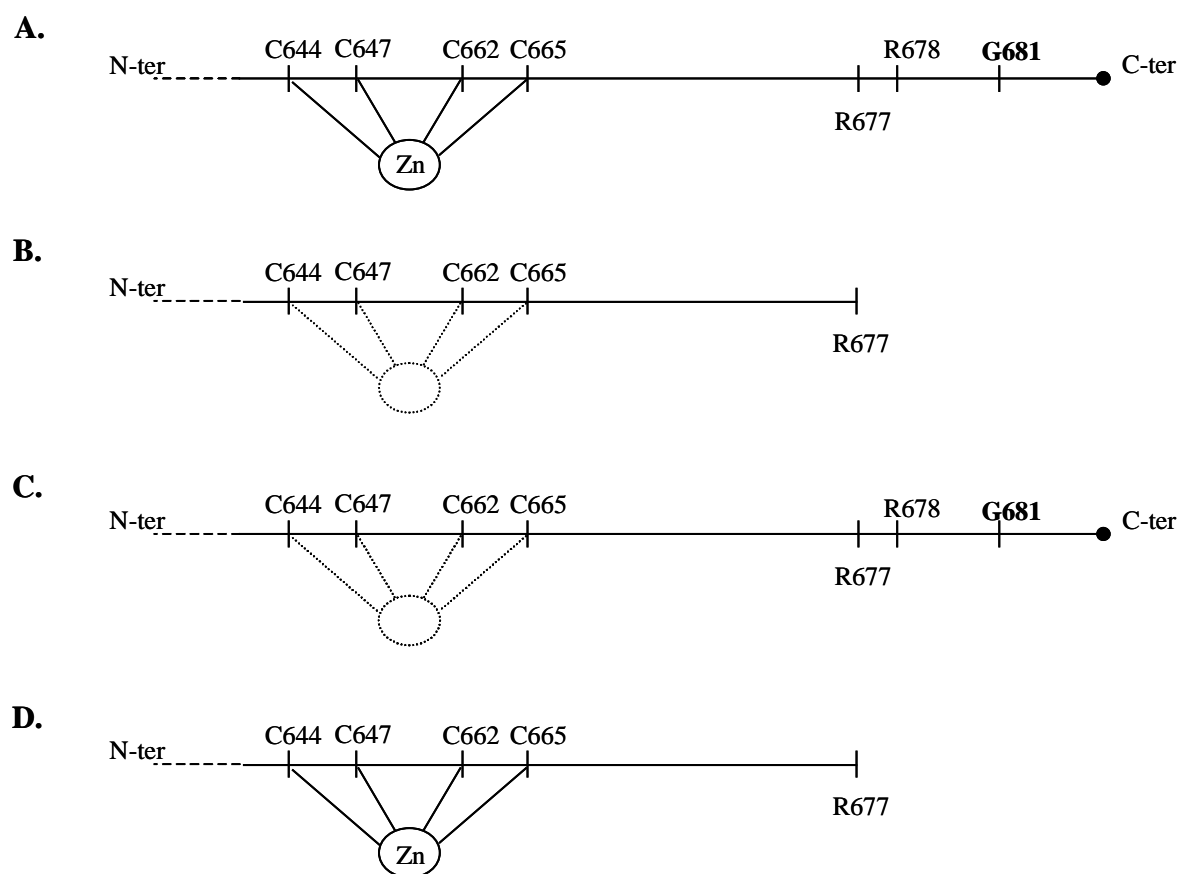


Figure E.1 - Hétérogénéité des anciennes préparations en terme de contenu en zinc et de structure primaire de la protéine α . Le schéma représente les extrémités C-terminales des formes potentiellement présentes dans une préparation de protéine α . La glycine 681 essentielle pour l'activité enzymatique est notée en gras.

Une même préparation de protéine α peut être constituée d'un mélange des quatre formes schématisées sur la figure E.1. Les formes A. et B. sont les plus probables ; toutefois la possibilité de réactiver partiellement certaines préparations suite à un traitement par le zinc, ainsi que la capacité de l'apoprotéine tronquée à réincorporer dans son site métallique le zinc exogène suggèrent respectivement l'existence des formes C. et D. L'irrégularité des activités enzymatiques des anciennes préparations serait liée à la variabilité des proportions des espèces en présence, les formes B. et D. tronquées étant par nature inactives. La présence d'un mélange d'espèces pourrait également expliquer en partie l'impossibilité d'obtenir une corrélation claire entre contenu en zinc et activité CTP réductase des anciennes préparations. Les nouvelles préparations contiennent majoritairement la forme intacte et métallée (A.) de la protéine α , comme l'attestent les expériences de spectrométrie de masse et les dosages de zinc.

Les nouvelles préparations de protéine α , très actives, contiennent près d'un atome de zinc par monomère. D'autre part certaines préparations démétallées sont partiellement réactivables par incubation réductrice de la protéine avec une source de zinc. Le zinc exerce donc un effet positif sur l'activité RNR. Une corrélation entre activité CTP réductase et contenu en zinc n'a pu être établie en raison de la difficulté à minimiser le risque de contamination en zinc, très présent dans les conditions du test d'activité standard. L'effet du zinc sur l'activité enzymatique a également été étudié par le biais des mutants du site métallique de la protéine α . Lorsque les protéines α C644A, α C647A, α C662A et α C665A sont exprimées et purifiées sans supplémentation en zinc, les préparations obtenues contiennent un mélange de formes intactes et protéolysées dont les proportions relatives diffèrent selon le mutant considéré, mais également entre les différentes préparations d'une même protéine. En effet les mutants possèdent des constantes d'association du zinc au site métallique inférieures à celle de la protéine sauvage ; cette propriété les défavorise dans la compétition avec les autres métalloprotéines pour la fixation du zinc présent dans le milieu de culture, et les rend plus susceptibles de perdre leur contenu métallique lors de la purification. L'enrichissement en zinc du milieu de culture et du tampon d'extraction a permis d'obtenir des mutants α C644A et α C662A majoritairement intacts et correctement métallés. Malgré ces

conditions favorables les deux protéines présentent une activité CTP réductase négligeable devant celle de l'enzyme sauvage. S'il est formé, il est possible que le radical Ado^\bullet arrache de manière non contrôlée un atome d'hydrogène présent dans le milieu réactionnel. Il pourrait alternativement oxyder spécifiquement la glycine 681, mais dans ce cas le radical Gly^\bullet résultant ne serait pas suffisamment stable pour être détecté. Cette question est examinée dans le chapitre II dans le cadre de l'étude de la formation du radical glycinyle de la protéine α .

- *Résultats* -

*Activation
de la protéine α*

Les études précédentes ont montré que la réaction d'activation de la protéine α nécessite la présence de DTT. Ce dithiol peut éventuellement être remplacé, bien que moins efficacement, par d'autres molécules possédant une fonction thiol (Ollagnier 1999). Il a ensuite été découvert que le système enzymatique NADPH : thiorédoxine : thiorédoxine réductase (les concentrations des deux enzymes étant de l'ordre de celle de la protéine α) est aussi efficace que le DTT utilisé en quantités millimolaires pour l'obtention d'une activité CTP réductase élevée, de l'ordre de 600 à 800 nmoles min⁻¹ mg⁻¹. L'incubation de la protéine α avec du NADPH en excès et des quantités catalytiques de thiorédoxine et de thiorédoxine réductase s'accompagne d'une consommation de NADPH se traduisant par la diminution de l'absorbance à 340 nm. La concentration de NADPH converti en NADP⁺ correspond en moyenne à la celle de la protéine α , indiquant que cette dernière subit une réduction à deux électrons. Ces résultats suggèrent que la protéine α se trouve sous une forme oxydée et que la réaction d'activation dépend de la présence de cystéines réduites. De plus, lorsque la protéine α est pré-réduite par le DTT ou le système thiorédoxine puis purifiée, l'activité CTP réductase élevée est obtenue en absence de tout réducteur supplémentaire (Padovani 2001b).

Considérant ces résultats nous avons d'abord fait l'hypothèse que la protéine α purifiée en aérobiose contient un pont disulfure. Nous avons d'abord cherché à identifier les deux cystéines engagées dans ce pont disulfure. Suite à la découverte que le DTT n'est en fait pas indispensable à l'activité RNR, nous avons alors étudié le processus d'activation de la protéine α afin de comprendre l'origine de l'effet stimulateur du DTT sur l'activité CTP réductase. Le mécanisme de formation du radical glycinyne ainsi que les facteurs influençant sa stabilité ont ainsi été réexaminés.

A - Le pont disulfure de la protéine α

A.I - Essai de localisation du pont disulfure par mutagenèse dirigée

Dans un premier temps une approche par mutagenèse dirigée basée sur l'observation

de la structure cristallographique de la protéine α du bactériophage T4 a été choisie. Du fait de leur proximité spatiale les cystéines C449 et C579 semblent être de bons candidats pour la formation d'un pont disulfure. Leur position par rapport au site actif de l'enzyme est illustrée sur la figure A.1.

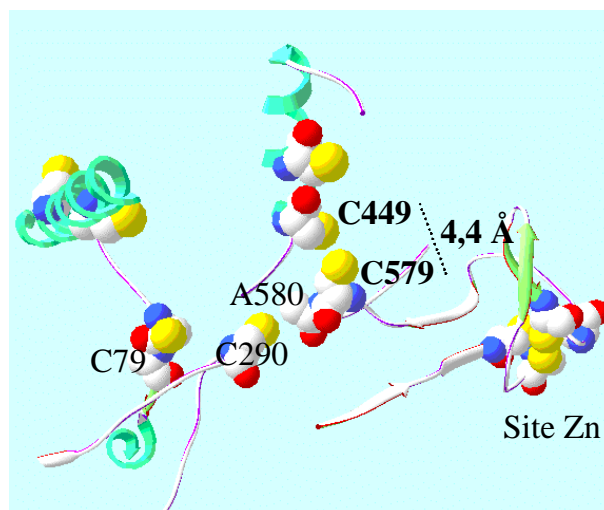


Figure A.1 - Position des cystéines C449 et C579 par rapport au site actif de la protéine α (G580A) du bactériophage T4. Le site de fixation présumé du substrat se situe entre les cystéines 79 et 290 du site actif. La structure a été résolue à 2,45 Å en présence de 5 mM de DTT. Les atomes de soufre sont représentés par des sphères jaunes.

La cystéine 579 est immédiatement adjacente au site glycine radicalaire muté en alanine dans la structure (A580) et la cystéine 449 se situe à l'extrémité N-terminale d'une hélice α . Les atomes de soufre des deux résidus sont séparés de 4,4 Å ; la formation d'un pont disulfure entre ces cystéines dans l'enzyme native (non réduite) est *a priori* envisageable. Le pont disulfure pourrait contrôler l'accès du radical Ado^\bullet à la glycine 580 et donc le transfert de radical ultérieur à la cystéine 290 du site actif. Nous avons donc entrepris la construction et l'étude des deux mutants Cys \rightarrow Ala correspondants de la protéine α d'*E. coli*, c'est-à-dire les protéines αC550A et αC680A .

A.I.1 - Préparation des mutants α C550A et α C680A

Les mutants α C550A et α C680A ont été surexprimés en aérobiose à partir des plasmides pT7 α C550A et pT7 α C680A construits comme indiqué dans la partie Matériels et Méthodes. Les profils de purification des mutants par chromatographie d'interactions hydrophobes sont similaires à celui de la protéine α sauvage. L'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF indique que la protéine α C550A est intacte ; par contre comme le montre la figure A.2 la protéine α C680A est obtenue sous une forme tronquée.

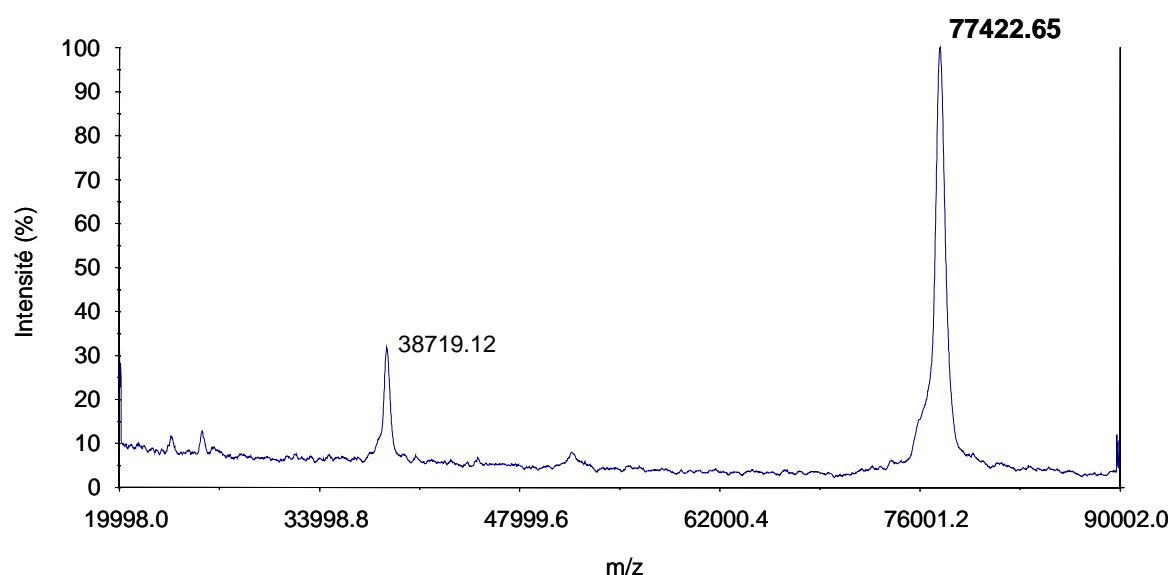


Figure A.2 - Spectre de masse MALDI-TOF de la protéine α C680A.

Le pic dont la valeur de m/z est notée en gras correspond à l'espèce ionique $[M+H]^+$ où M représente la molécule de protéine α C680A monomérique tronquée. Le pic correspondant à l'espèce doublement chargée $[M+2H]^{2+}$ est également visible.

La masse obtenue sur la figure A.2 pour le monomère de protéine α C680A est significativement inférieure à la masse théorique du mutant, égale à 79991 Da, mais supérieure aux valeurs obtenues avec la protéine α sauvage et les mutants du site métallique déficients en zinc, voisins de 76000 Da. Il semble donc que le site de coupure dans le mutant α C680A soit différent de celui des autres protéines. Afin de vérifier cette hypothèse le mutant

α C680A a été analysé par spectrométrie de masse électrospray. Le spectre correspondant est présenté sur la figure A.3.

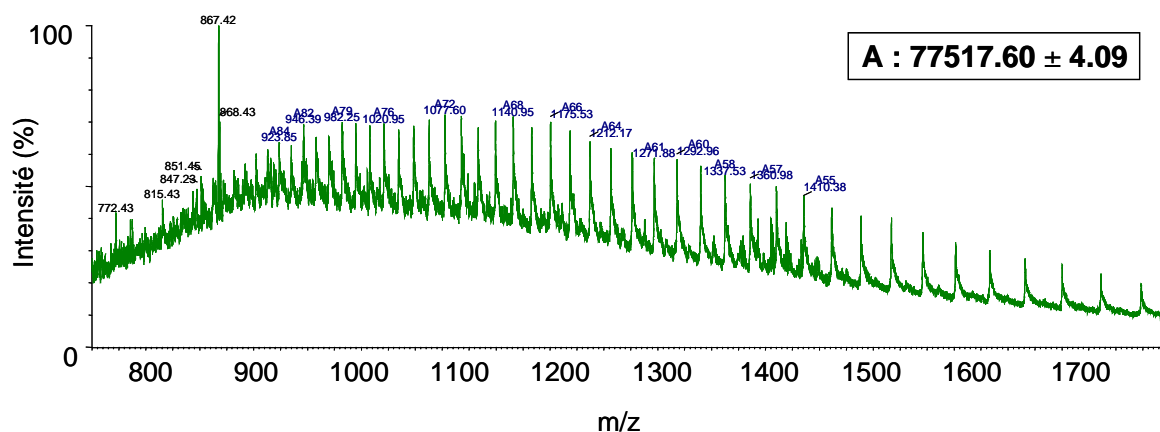


Figure A.3 - Spectre de masse électrospray brut obtenu en conditions dénaturantes de la protéine α C680A. La masse calculée de la protéine est indiquée sur le spectre.

La masse calculée de la protéine, égale à 77517 Da, est compatible avec la coupure de la chaîne polypeptidique entre les résidus Pro690 et Phe691, schématisée sur la figure A.4. L'intégrité de la séquence N-terminale des mutants a été vérifiée par séquençage.

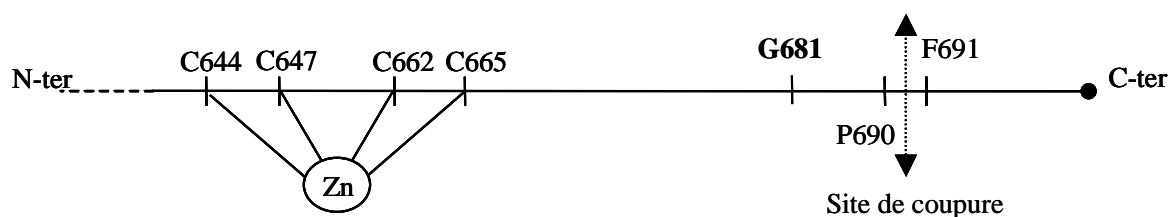


Figure A.4 - Localisation du site de coupure de la protéine α C680A. D'après les études de spectrométrie de masse électrospray la protéolyse de la chaîne polypeptidique s'effectue entre les acides aminés Pro690 et Phe691.

Comme le montre la figure A.4 la coupure de la chaîne polypeptidique du mutant α C680A s'effectue en aval de la glycine 681 ; le fragment C-terminal éliminé comportant 22 acides aminés représente environ 3% de la longueur totale de la protéine. La situation est donc différente de celle observée avec la protéine α sauvage et les mutants du site métallique déficients en zinc, pour lesquels la protéolyse provoque la perte de la glycine catalytique. Quelles que soient les conditions utilisées pour exprimer et purifier la protéine (notamment en ce qui concerne le zinc), cette coupure spécifique est toujours observée de manière quantitative. Les études décrites ci-après ont donc été réalisées avec une préparation de protéine α C680A tronquée au niveau du résidu P690.

A.I.2 - Activité CTP réductase des mutants

Si les cystéines 550 et 680 forment effectivement un pont disulfure dont la réduction est nécessaire à l'activation de la protéine α , l'activité CTP réductase des mutants correspondants devrait être indépendante du DTT. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau A.1.

Protéine	Activité spécifique (%)	
	- DTT	+ DTT
α sauvage	0	100
α C550A	0	110
α C680A	0	0

Tableau A.1 - Activité CTP réductase des mutants α C550A et α C680A. Les protéines ont été incubées pendant 1 h en anaérobiose avec le mélange d'activation en absence ou en présence de 5 mM de DTT. La réaction de réduction a alors été initiée par l'ajout de CTP, d'ATP et de formiate comme indiqué dans la partie Matériels et Méthodes.

Aucun des deux mutants ne présente d'activité CTP réductase mesurable en absence de DTT. Le mutant α C550A, dont l'activité CTP réductase est dépendante du DTT, se comporte de manière similaire à la protéine α sauvage. La cystéine 550 n'est donc pas engagée dans un pont disulfure avec la cystéine 680. La protéine α C680A est complètement inactive même en présence de DTT, probablement en raison de la proximité du résidu muté vis-à-vis de la glycine radicalisée.

A.I.3 - Etat rédox des mutants

La caractérisation des mutants α C550A et α C680A a été poursuivie par l'utilisation du système NADPH : thiorédoxine : thiorédoxine réductase. Les résultats sont indiqués dans le tableau A.2.

Protéine	Consommation de NADPH	Nombre de ponts disulfures équivalents
α sauvage ¹	+	≈ 1
α C550A	+	≈ 1
α C680A	-	0

Tableau A.2 – Etat rédox des protéines α C550A et α C680A. L'état rédox des protéines a été déterminé avec le système NADPH : thiorédoxine : thiorédoxine réductase comme indiqué dans la partie Matériels et Méthodes. ¹Les résultats indiqués correspondent à la moyenne obtenue à partir de l'analyse de plusieurs préparations de protéine α dont le contenu en zinc est indéterminé.

Le mutant α C550A demeure substrat de la thiorédoxine ; la cystéine 550 ne forme donc pas de pont disulfure avec un autre partenaire. Par contre aucune consommation de NADPH n'est mesurée lorsque la même expérience est réalisée avec la protéine α C680A. La cystéine 680 pourrait ainsi être engagée dans un pont disulfure avec une cystéine non identifiée. Toutefois la structure cristallographique de l'enzyme du bactériophage T4 ne fait

pas apparaître de candidat pour la formation de ce pont disulfure.

Alternativement, la cystéine 680 pourrait être oxydée en un acide sulfénique (RSOH). Les acides sulféniques, dont l'existence dans plusieurs systèmes enzymatiques est bien établie, participent directement à la catalyse ou sont impliqués dans une signalisation redox (Poole 2004). Ces espèces réactives sont réductibles par le DTT et la thiorédoxine. La présence d'un acide sulfénique en position 680 de la protéine α est envisageable ; l'utilisation de réactifs classiquement employés pour mettre en évidence les acides sulféniques, tels que le 2-nitro-5-thiobenzoate (TNB) ou le 7-chloro-2-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl), n'ont pas permis de détecter d'acide sulfénique dans la protéine α sauvage.

A.II – Zinc et état redox de la protéine α

Bien que le fait que le mutant α C680A ne soit pas substrat de la thiorédoxine demeure inexpliqué, les résultats précédents montrent que les cystéines 550 et 680 ne sont pas engagées dans un pont disulfure. Afin de déterminer si le protocole d'obtention de la protéine α exerce une influence sur l'état redox de cette dernière, l'effet du système NADPH : thiorédoxine : thiorédoxine réductase sur plusieurs préparations de protéine α sauvage a été étudié. Dans un premier temps l'état redox de deux préparations de protéine α intactes et correctement métallées a été déterminé. Les cinétiques de consommation du NADPH obtenues sont présentées sur la figure A.5.

La concentration de NADPH converti en NADP^+ est calculée à partir du ΔDO à 340 nm, ce qui permet de déduire directement le nombre de ponts disulfures équivalents initialement présents dans la protéine α . Ainsi les concentrations de NADPH consommé en présence des protéines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont respectivement égales à 450 et 129 μM ; les protéine $\alpha 1$ et $\alpha 2$ contiennent donc respectivement 0,53 et 0,13 pont disulfure par monomère. Ces valeurs sont significativement éloignées de celles obtenues antérieurement au laboratoire avec des protéines préparées selon l'ancien protocole de purification et qui comportaient en moyenne un pont disulfure par monomère. De plus l'état redox des deux préparations utilisées dans

cette étude semble être différent et apparemment lié à leur contenu en zinc, puisque les protéines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ contiennent respectivement 0,75 et 0,9 atome de zinc par monomère.

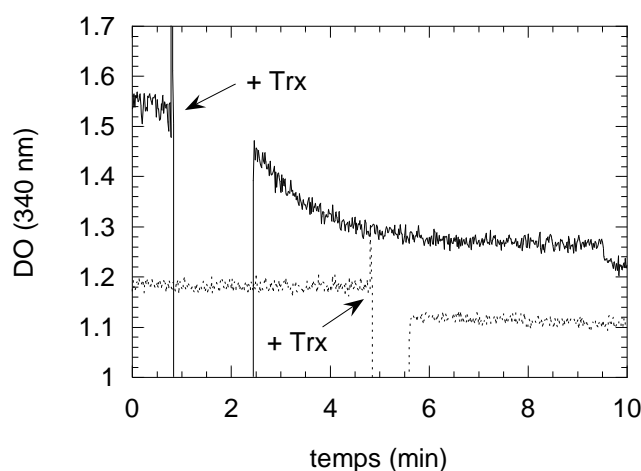


Figure A.5 - Cinétique d'oxydation du NADPH en présence de la protéine α , de thiorédoxine et de thiorédoxine réductase. La protéine $\alpha 1$ (845 μ M, trait plein) ou $\alpha 2$ (1,03 mM, trait pointillé) a été incubée en boîte à gants dans une cuve de 0,1 cm de trajet optique avec du NADPH (2,7 mM pour $\alpha 1$, 2 mM pour $\alpha 2$) et de la thiorédoxine réductase (2,1 μ M) puis de la thiorédoxine (Trx, 3,6 μ M) a été ajoutée et la réaction suivie pendant 10 minutes. Le Δ DO mesuré à 340 nm est indiqué pour chaque protéine par une flèche à deux pointes.

De manière à vérifier si l'état redox de la protéine α est effectivement dépendant de la quantité de zinc présent dans le site métallique, la consommation de NADPH en présence de protéines α pauvres en zinc, de thiorédoxine et de thiorédoxine réductase a été mesurée. Deux types de préparations ont été utilisées. L'une contient la protéine α majoritairement sous forme protéolysée. L'autre résulte du traitement par le TPEN d'une préparation de protéine α intacte et correctement métallée ; l'intégrité de la protéine obtenue a été vérifiée par spectrométrie de masse MALDI-TOF. La figure A.6 présente les cinétiques d'oxydation du NADPH correspondantes.

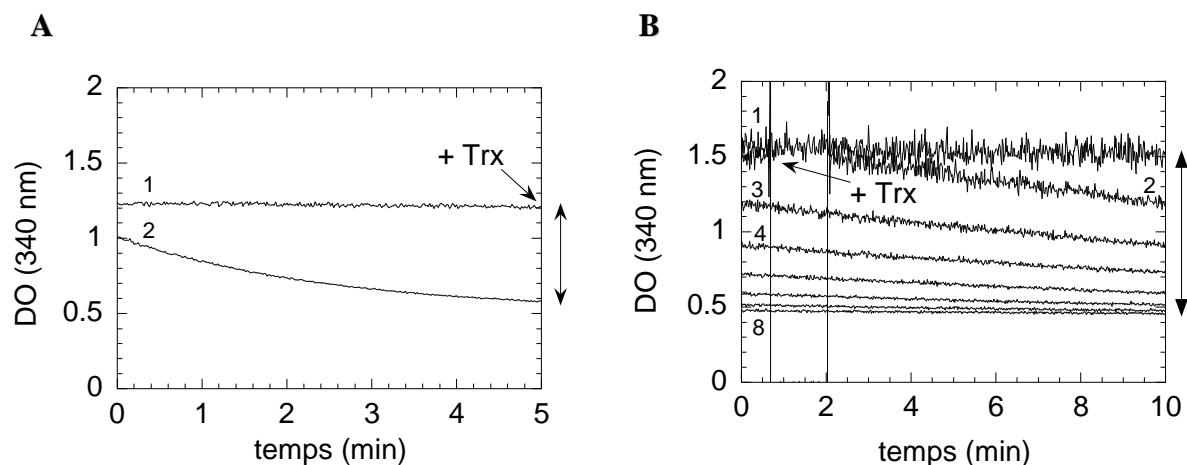


Figure A.6 - Cinétiques d'oxydation du NADPH en présence de la protéine α tronquée ($\alpha 3$, A) ou traitée au TPEN ($\alpha 4$, B), de thiorédoxine et de thiorédoxine réductase. La protéine $\alpha 4$ a été obtenue par incubation de la protéine α métallée (250 μ M) dans du tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8, KCl 50 mM chélexé avec du TPEN (10 mM) et du DTT (20 mM) pendant 3 jours à 4°C puis purification sur colonne NAP-25. Les protéines $\alpha 3$ (530 μ M, 0,12 Zn/ α) ou $\alpha 4$ (495 μ M, 0,16 Zn/ α) ont été incubées en boîte à gants dans une cuve de 0,1 cm de trajet optique avec du NADPH (2 mM) et de la thiorédoxine réductase (2,1 μ M) puis de la thiorédoxine (Trx, 3,6 μ M) a été ajoutée et la réaction suivie pendant 10 à 80 min. Les cinétiques ont été effectuées selon 2 séquences de 5 min (1 à 2, A) ou 8 séquences de 10 min (1 à 8, B). Le Δ DO mesuré à 340 nm est indiqué pour chaque protéine par une flèche à deux points.

Des calculs similaires à ceux effectués précédemment montrent que la protéine tronquée $\alpha 3$, possédant 0,12 atome de zinc par monomère, contient 2,1 ponts disulfures par monomère. La protéine traitée au TPEN $\alpha 4$ possède 0,16 zinc et 3,4 ponts disulfures par monomère. Ces résultats confirment que l'état redox de la protéine α est dépendant de la quantité de zinc associé au site métallique $\text{Zn}(\text{Cys})_4$. Plus précisément, il apparaît que le nombre de ponts disulfures est inversement proportionnel au taux d'occupation du site métallique de la protéine α , comme le montre la figure A.7. Ces mesures de consommation de NADPH en présence de thiorédoxine et de thiorédoxine réductase suggèrent fortement que les cystéines du site $\text{Zn}(\text{Cys})_4$ sont sensibles à l'oxydation lorsqu'elles ne sont pas engagées dans la coordination du zinc.

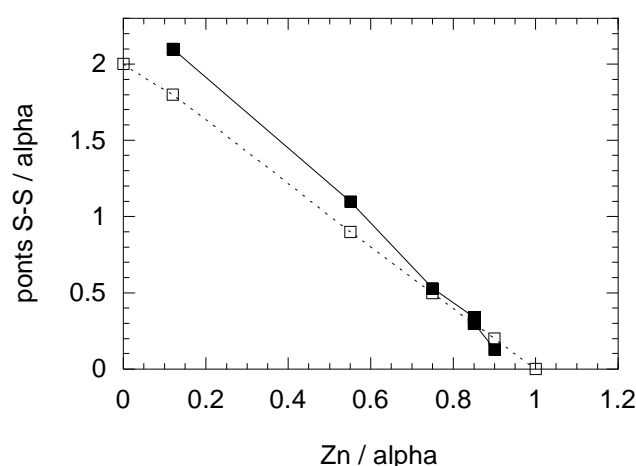


Figure A.7 - Corrélation entre contenu en zinc et état rédox de la protéine α . Le nombre de ponts disulfures par monomère obtenu à partir des cinétiques d'oxydation du NADPH (carrés pleins) et le nombre théorique maximal de ponts disulfures par monomère calculé à partir du taux d'occupation du site métallique (carrés vides) sont portés en fonction de la quantité de zinc spécifique par monomère déterminée par colorimétrie.

En supposant que deux ponts disulfures peuvent se former dans le site métallique de la protéine α et en connaissant le taux d'occupation du site par le zinc, le nombre théorique maximal de ponts disulfures par monomère peut être calculé pour chaque préparation. La proximité de cette valeur théorique avec le nombre de ponts disulfures déterminé expérimentalement (figure (A.7)) suggère que l'absence de zinc dans la protéine α se traduit par la formation de deux ponts disulfures par monomère, très probablement localisés au niveau des deux doublets CXXC constituant le site métallique. Seule la protéine $\alpha 4$ présente un comportement différent et ne peut être placée sur la droite expérimentale de la figure A.7. En effet dans ce cas le nombre de ponts disulfures mesuré est deux fois plus élevé que le nombre théorique maximal ; d'autre part la cinétique d'oxydation du NADPH par la protéine $\alpha 4$ est beaucoup plus lente que celle observée avec une protéine α non démétallée par le TPEN. Il est possible que le traitement par le chélateur ait provoqué une modification structurale de l'enzyme conduisant à la formation de ponts disulfures intra et/ou intermoléculaires supplémentaires.

A.III – Activité CTP réductase et DTT

L'analyse de l'état rédox de différentes préparations de protéine α a montré que ces dernières contiennent entre zéro et deux ponts disulfures par monomère en fonction de la quantité de zinc présente dans l'enzyme. Il est donc concevable que le DTT nécessaire à l'activation des protéines α utilisées antérieurement avait pour fonction de réduire les ponts disulfures résultant d'une incorporation sous-stœchiométrique de zinc dans le site métallique. Si tel est le cas les activités CTP réductase des nouvelles préparations de protéine α obtenue essentiellement sous forme métallée devraient être similaires en absence et en présence de DTT. La moyenne des résultats obtenus est présentée dans le tableau A.3.

	- DTT	+ DTT
Activité spécifique (nmoles min ⁻¹ mg ⁻¹)	50	1200

Tableau A.3 - Activité CTP réductase des nouvelles préparations de protéine α en absence et en présence de DTT. Les valeurs indiquées représentent la moyenne des activités de 10 préparations contenant au minimum 0,75 zinc par monomère.

En absence de DTT, les nouvelles préparations de protéine α présentent une activité CTP réductase significative, qui reste néanmoins faible devant celle mesurée en présence de DTT, malgré le fait que le taux d'occupation du site métallique soit supérieur à 75%. Ainsi le DTT stimule l'activité CTP réductase d'un facteur 10 à 20 en fonction des préparations. Le dithiol n'a donc pas pour unique fonction de réduire les ponts disulfures de la protéine α , mais joue un rôle additionnel se traduisant par une stimulation importante de l'activité CTP réductase. L'observation d'une activité CTP réductase non nulle en absence de DTT remet en cause la conclusion établie lors des études précédentes selon laquelle le DTT est essentiel à l'activation de la protéine α . Il nous a donc semblé nécessaire de réexaminer en détail le

processus d'activation et en particulier le mécanisme de formation du radical glycinyle de la protéine α en tenant compte de l'influence du DTT sur la réaction étudiée .

B - Activation de la protéine α

B.I - Mécanisme de formation du radical glycinyle

B.I.1 - Aspect thermodynamique

L'hypothèse mécanistique pour l'activation de la RNR anaérobie d'*E. coli* par le système réducteur physiologique de la protéine β est rappelée sur la figure B.1.

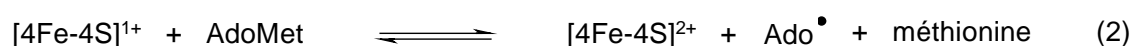
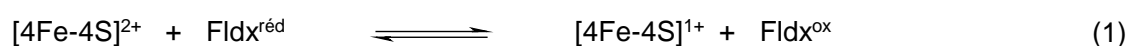


Figure B.1 - Mécanisme général de formation du radical glycinyle de la protéine α .
 $\text{Fldx}^{\text{réd}}$ = flavodoxine réduite ; Fldx^{ox} = flavodoxine oxydée.

La réduction du centre fer-soufre de la protéine β par l'une ou l'autre des formes réduites de la flavodoxine n'est pas favorable d'un point de vue thermodynamique. Cependant l'ajout de la forme SQ ou de la forme HQ de la flavodoxine au mélange d'activation contenant les protéines α et β conduit à la réductolyse de la SAM et à la formation du radical glycinyle. Ce résultat a été interprété comme résultant d'un couplage entre la réaction de réduction du centre fer-soufre, thermodynamiquement non favorable, et la réaction favorable d'oxydation de la glycine 681 par le radical Ado^{\bullet} . En effet il a été montré que le remplacement de la glycine 681 par une alanine dans la protéine α provoque une diminution

drastique de la quantité de méthionine produite lors de la réaction d'activation (Mulliez 2001). Les propriétés de liaison du mutant α G681A avec la protéine β ne sont qualitativement pas modifiées par rapport à celles de la protéine α sauvage ; il en est de même pour la fixation de la SAM au complexe entre l'activase et la réductase. La présence de la glycine 681 de la protéine α est donc indispensable à la production quantitative de méthionine et de 5'-déoxyadénosine par la protéine β lorsque l'activation est menée en présence du système flavodoxine. Toutefois ce résultat important a été établi à l'époque avec un mutant dont le contenu en zinc et l'intégrité structurale n'étaient pas connus. Nous avons donc voulu valider cette conclusion en reproduisant l'expérience avec une préparation de protéine α G681A intacte.

B.I.1.a - Préparation de la protéine α G681A

La protéine α G681A a été surexprimée en anaérobiose puis purifiée par chromatographie d'affinité d'ATP Sepharose comme indiqué dans la partie Matériels et Méthodes. Le milieu de culture ainsi que le tampon d'extraction ont été enrichis en zinc. La protéine purifiée est intacte comme l'a montré l'analyse par spectrométrie de masse.

B.I.1.b - Activité SAM réductase

Les activités SAM réductase de la protéine β seule, en présence du mutant α G681A ou de protéine α sauvage ont été suivies au cours du temps. Les cinétiques obtenues sont présentées sur la figure B.2. La quantité de 5'-désoxyadénosine produite en présence du mutant α G681A représente moins de 1% de la quantité formée en présence de la protéine α sauvage ; dans les conditions de concentrations utilisées aucune production d'AdoH par la protéine β seule n'a été détectée par CLHP. Ces résultats confirment l'existence d'un couplage thermodynamique entre la réaction de réduction du centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ de la protéine β par le système flavodoxine et la réaction d'oxydation de la glycine 681 par le radical Ado^\bullet . Il faut noter que lorsque le centre fer-soufre de la protéine β est pré-réduit chimiquement ou photochimiquement, le processus d'activation ne fait plus intervenir de réaction

thermodynamiquement non favorable ; la réductolyse de la SAM par la protéine β s'effectue alors en présence de la protéine α sauvage comme en présence du mutant α G681A, bien que dans ce dernier cas la cinétique de production de méthionine soit plus lente (Padovani 2002).

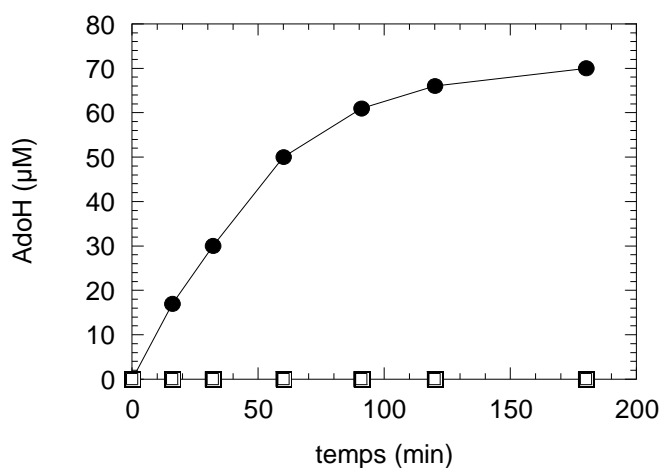


Figure B.2 - Cinétiques de réductolyse de la SAM par la protéine β seule (carrés blancs), complexée à la protéine α sauvage (ronds) ou à la protéine α G681A (carrés noirs) en présence du système flavodoxine. La protéine β (50 μ M) a été mélangée dans la boîte à gants dans du tampon Tris-HCl 100 mM pH 8, KCl 50 mM avec du NADPH (2,5 mM), de la thiorédoxine (3 μ M), de la thiorédoxine réductase (1,5 mM), de la flavodoxine (6 μ M), de la flavodoxine réductase (4,6 μ M) soit seule, soit en présence de protéine α sauvage (50 μ M) ou de protéine α G681A (50 μ M). La réaction a été initiée par l'ajout de 1,5 mM de SAM. Aux temps indiqués 50 μ L de solution ont été prélevés et la 5'-désoxyadénosine analysée comme indiqué dans la partie Matériels et Méthodes.

B.I.2 - Transfert de radical de Ado \cdot à la glycine 681

L'activation de la RNR anaérobie est un processus post-traductionnel qui met en jeu un transfert de radical inter-protéines : le radical 5'-désoxyadénosyle, formé lors de la réductolyse de la *S*-adénosylméthionine liée au centre $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ de l'activase, est l'espèce oxydante responsable de la formation du radical glycinyle de la réductase. Aucune structure

cristallographique d'un complexe entre les deux protéines n'étant disponible, il n'est pas possible de connaître précisément les positions relatives du complexe Fe/S-SAM de β et de la glycine 681 de α . Ainsi le transfert de radical s'effectue soit de manière directe à courte distance, soit de manière indirecte par l'intermédiaire de relais constitués par les chaînes latérales de certains acides aminés de l'activase et/ou de la réductase. Ces deux hypothèses sont schématisées sur la figure B.3.

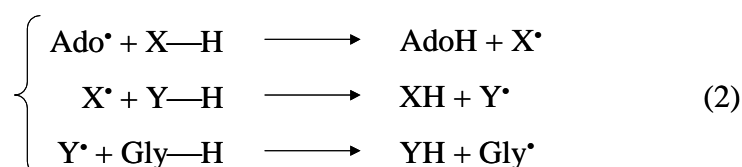


Figure B.3 - Hypothèses envisageables pour le transfert du radical de Ado $^\bullet$ à la glycine 681 de la RNR anaérobie d'*E. coli*.
L'oxydation de la glycine s'effectue directement ((1)) ou indirectement ((2)) avec l'intervention d'un ou plusieurs relais. Une chaîne à deux intermédiaires radicalaires X $^\bullet$ et Y $^\bullet$ est donnée en exemple sur cette figure.

Afin de déterminer laquelle de ces deux propositions caractérise le système de la RNR anaérobie, nous avons choisi d'étudier l'activation d'une protéine α dont les glycines sont deutérées sur le carbone α , nommée αGlyD . D'après le contenu en deutérium de la 5'-désoxyadénosine formée, cette expérience de marquage isotopique devrait permettre de répondre à la question du transfert de radical entre les protéines α et β . Une première étude a été réalisée avec une protéine αGlyD qui n'a pas été analysée par spectrométrie de masse ; suite à la découverte du phénomène de protéolyse affectant les protéines déficientes en zinc, l'expérience a été reproduite avec une nouvelle préparation de protéine αGlyD caractérisée d'un point de vue structural afin de valider les résultats préliminaires obtenus.

B.I.2.a - Première étude❖ *Préparation de la protéine α GlyD*

La protéine α GlyD a été surexprimée en aérobiose, dans du milieu M9 complémenté en glucose, $\text{FeSO}_4/\text{citrate}$, MgSO_4 , vitamine B1, ZnCl_2 et ($^2\text{H}, ^2\text{H}$)-glycine et inoculé à 1‰ avec une préculture réalisée en milieu LB. La protéine a ensuite été purifiée par chromatographie sur support hydrophobe (nouveau protocole) comme indiqué dans la partie Matériels et Méthodes.

❖ *Activation de la protéine α GlyD*

L'introduction du radical glycinyle dans la protéine α GlyD a été réalisée de deux manières différentes. Dans l'expérience en conditions stœchiométriques, le centre fer-soufre de la protéine β est pré-réduit chimiquement ; la protéine est ensuite débarrassée du réducteur de telle sorte que le centre $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ oxydé au cours de la réaction d'activation n'est pas régénéré. L'activation peut également être menée en conditions catalytiques, en utilisant le système réducteur enzymatique de la protéine β .

Expérience en conditions stœchiométriques

En boîte à gants, le centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ de la protéine β reconstituée est réduit par le dithionite en présence de DTT puis l'enzyme est purifiée par chromatographie de filtration sur gel. La protéine α GlyD est traitée pendant 60 min par le système NADPH : thiorédoxine : thiorédoxine réductase puis ajoutée en quantité équimolaire à la protéine β^{red} sans purification intermédiaire. Deux tubes RPE sont préparés, l'un avant et l'autre 8 minutes après l'ajout de SAM initiant la réaction d'activation. Les spectres correspondants sont présentés sur la figure B.4. Le spectre A montre le signal axial du centre $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ de la protéine β complexée à la protéine α GlyD. L'intégration du signal fournit la concentration du centre réduit initialement présente et permet donc de déterminer la quantité maximale de radical glycinyle pouvant être atteinte au terme de l'activation. Le centre $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ en présence de SAM provoque la formation du radical glycinyle de la protéine α GlyD : le signal observé sur le spectre B est un

singulet, témoignant de la deutération majoritaire de la glycine 681. Aucune trace du centre $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ n'est ici détectable ; 8 min après l'ajout de SAM, la réaction d'activation est donc achevée. L'efficacité du transfert de radical est évaluée d'après la concentration du radical GlyD^\bullet obtenue par intégration du signal.

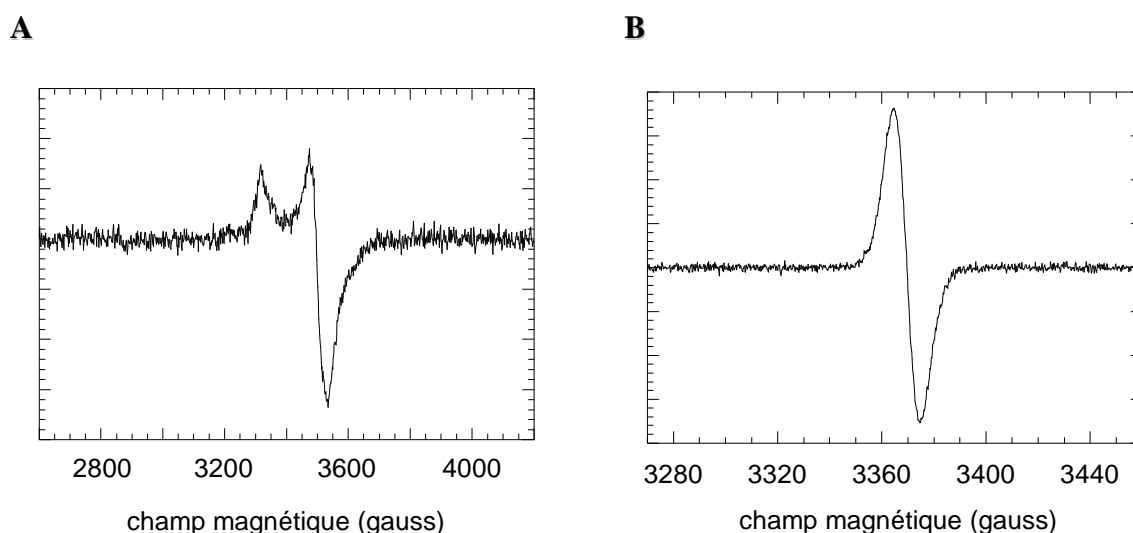


Figure B.4 - Spectres RPE bande X obtenus avant (A) et après (B) l'ajout de SAM au complexe $\alpha\text{GlyD}^{\text{red}} \beta^{\text{red}}$. A, spectre de référence du centre $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ dans le complexe $\alpha\text{GlyD}^{\text{red}} \beta^{\text{red}}$ (106 μM) ; B, spectre du radical GlyD^\bullet obtenu 8 min après l'ajout de SAM (1 mM) au complexe. Conditions d'enregistrement : 10 K (A) ou 20 K (B), 2 μW , 1 mT, $2 \cdot 10^5$.

Activation catalytique

Dans l'expérience d'activation catalytique, tous les composants nécessaires à la réaction sont réunis. Le centre $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ de la protéine β est continuellement régénéré par l'action du système physiologique NADPH : flavodoxine : flavodoxine réductase. La réaction d'activation a été menée soit en présence de DTT (5 mM), soit en présence du système catalytique NADPH : thiorédoxine : thiorédoxine réductase. Le mélange contient donc les protéines αGlyD et β en quantités équimolaires, du NADPH, de la flavodoxine, de la flavodoxine réductase et soit du DTT, soit de la thiorédoxine et de la thiorédoxine réductase. L'activation est initiée par l'ajout de SAM et deux tubes RPE sont préparés après 10 et 20 minutes de réaction. De la même manière que pour l'expérience en conditions

stoechiométriques, la formation du radical glycinyle est ensuite analysée par spectroscopie de RPE. Les signaux observés sont tout à fait similaires à celui du radical GlyD[•] de la figure B.4.

◆ *Analyse isotopique de la 5'-désoxyadénosine*

Purification de la 5'-désoxyadénosine

La 5'-désoxyadénosine formée lors du processus d'activation est purifiée par chromatographie liquide haute performance. Après décongélation du contenu des tubes RPE, les protéines sont précipitées par du TCA 1 M (20% v/v). Le surnageant est injecté sur une colonne analytique C18. L'élution s'effectue avec un gradient linéaire de 0 à 28% d'acétonitrile dans du TFA 0,1%. La solution de 5'-désoxyadénosine purifiée est récupérée puis lyophilisée. Une gamme étalon donnant l'aire du pic d'AdoH en fonction de la quantité injectée est préalablement établie dans les mêmes conditions avec de la 5'-désoxyadénosine commerciale, de manière à calculer la concentration d'AdoH produite. La figure B.5 montre la droite de corrélation obtenue, ainsi qu'un exemple de chromatogramme de purification de la 5'-désoxyadénosine.

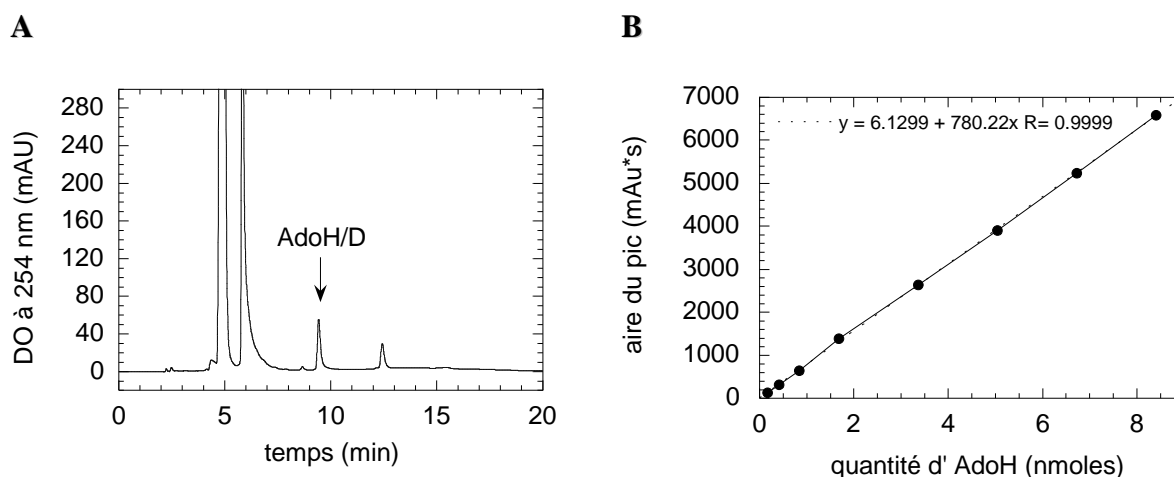


Figure B.5 - Chromatogramme de purification de la 5'-désoxyadénosine par CLHP (A) et droite de corrélation donnant l'aire du pic d'AdoH en fonction de la quantité injectée (B).

Détermination du pourcentage de deutération

L'incorporation de deutérium dans la 5'-désoxyadénosine a été analysée par spectrométrie de masse électrospray en mode positif. Le spectre relatif à l'expérience d'activation en conditions stœchiométriques est présenté sur la figure B.6

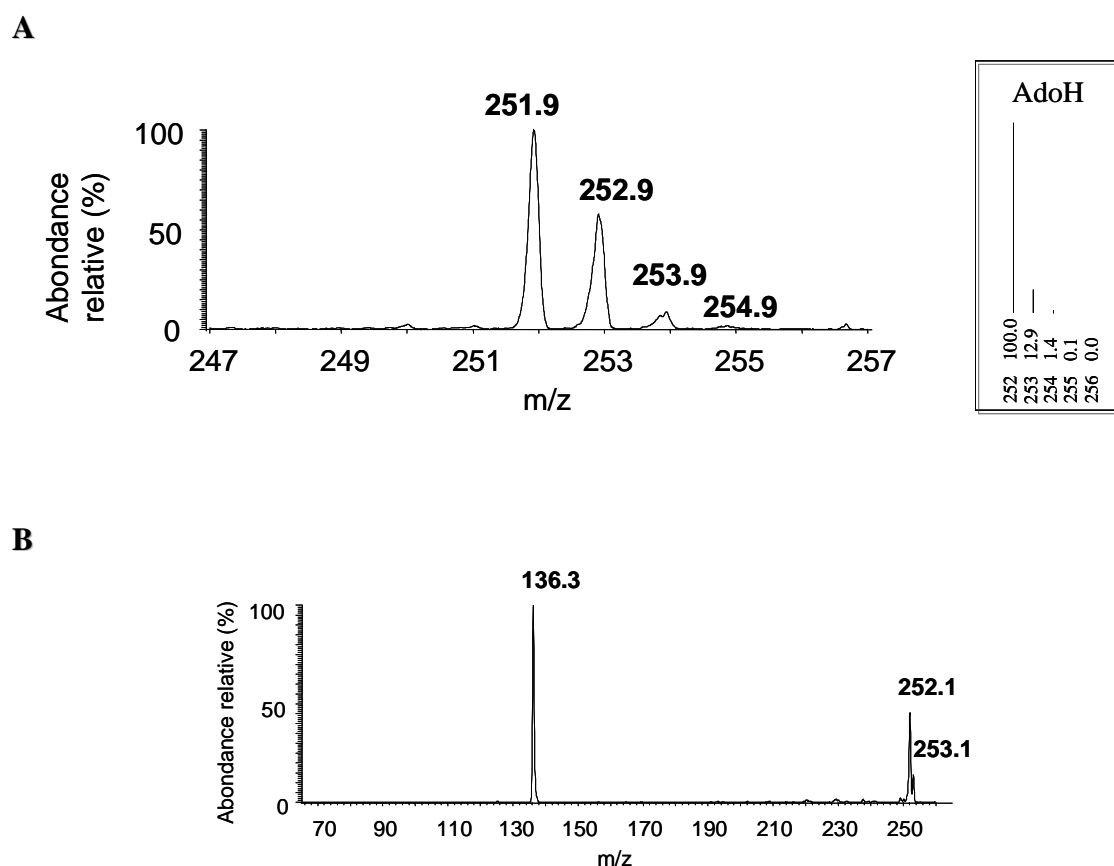


Figure B.6 – Détermination du pourcentage de deutération de la 5'-désoxyadénosine. A, spectre de masse électrospray de la 5'-désoxyadénosine purifiée formée lors de l'activation de la protéine α GlyD en conditions stœchiométriques. Le spectre a été enregistré en mode positif avec la fonction zoomscan dans la fenêtre de m/z indiquée. Le profil du massif isotopique calculé pour la molécule de 5'-désoxyadénosine protonée est présenté dans l'encadré. B, spectre de masse électrospray obtenu en mode positif par fragmentation de la 5'-désoxyadénosine détectée sur le spectre A.

Le massif isotopique du spectre A résulte du mélange de deux espèces $[M+H]^+$ et $[M'+H]^+$, où M et M' représentent respectivement la molécule de 5'-désoxyadénosine protonée (AdoH) et la molécule de 5'-désoxyadénosine deutérée (AdoD). Le spectre B montre

que les deux ions moléculaires se fragmentent en une espèce unique dont la masse correspond à celle de l'ion monochargé du noyau adénine. Cette observation indique que la deutération s'effectue sur le ribose, de manière attendue. Le pourcentage de 5'-désoxyadénosine deutérée peut être évalué grâce au relevé de la hauteur des pics du spectre A et en tenant compte de l'abondance relative des pics du massif isotopique de la 5'-désoxyadénosine protonée. Le calcul montre que l'activation en conditions stœchiométriques de la protéine α GlyD a conduit à la formation de 31% d'AdoD.

Les spectres analysant l'incorporation de deutérium dans la 5'-désoxyadénosine produite lors de l'activation catalytique de la protéine α GlyD sont présentés sur la figure B.7.

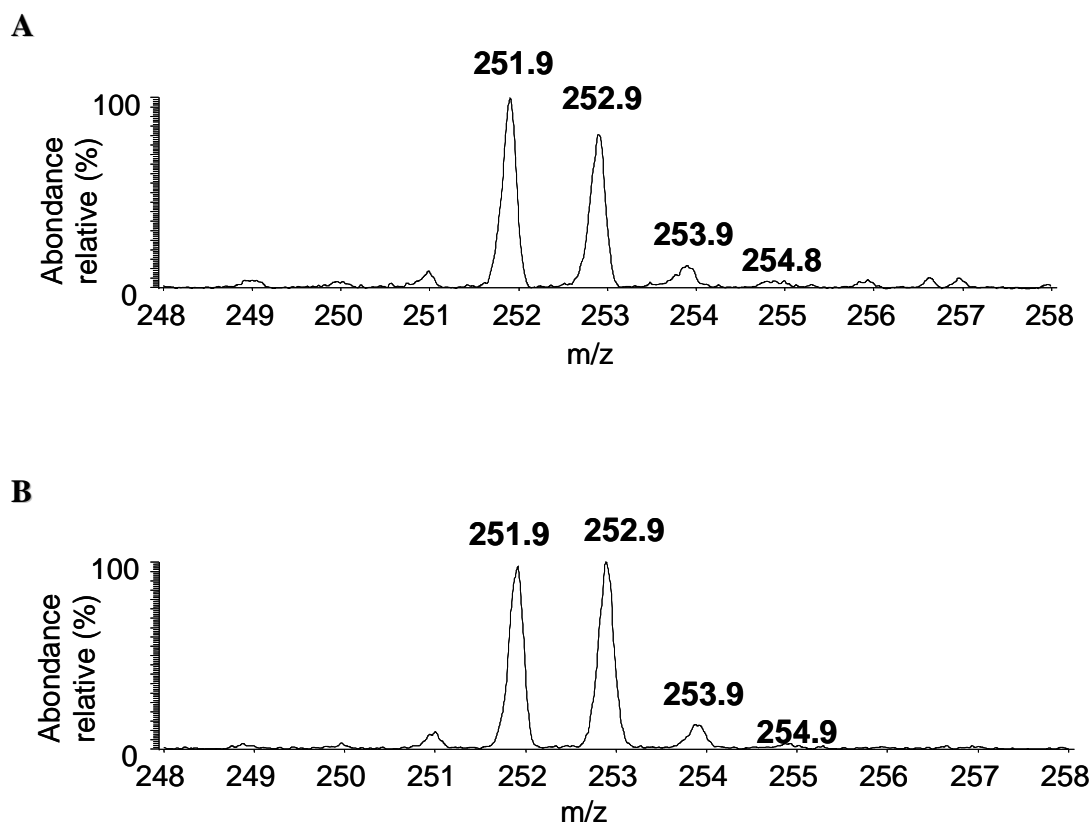


Figure B.7 - Spectres de masse électrospray de la 5'-désoxyadénosine purifiée formée lors de l'activation catalytique de la protéine α GlyD. Les spectres correspondent à l'analyse de la 5'-désoxyadénosine formée après 10 min de réaction en présence du système NADPH : thiorédoxine : thiorédoxine réductase (A) ou de DTT (B) et ont été enregistrés en mode positif avec la fonction zoomscan dans la fenêtre de m/z indiquée.

D'après les spectres de la figure B.7, l'activation catalytique de la protéine α GlyD en présence du système réducteur NADPH : thiorédoxine : thiorédoxine réductase conduit à la formation de 40% de 5'-désoxyadénosine deutérée après 10 minutes de réaction. Ce pourcentage s'élève à 47% lorsque le système réducteur enzymatique est remplacé par du DTT. Le taux d'incorporation de deutérium dans le nucléoside est inchangé après 20 minutes de réaction dans les deux cas.

◆ Bilan

Le tableau B.1 rassemble les données quantitatives issues des trois expériences d'activation de la protéine α GlyD.

Activation en conditions stœchiométriques		Activation catalytique			
		NADPH : Trx : Trr		DTT	
		10 min	20 min	10 min	20 min
α GlyD et β (μ M)	106	120		120	
$[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ (μ M)	31	—		—	
GlyD \bullet (μ M)	13	15	20	19	24
Méthionine (μ M)	ND	13	19	18	31
AdoH/D (μ M)	35	11	15	18	25
% AdoD	31	40	40	47	47
AdoD (μ M)	11	4	6	8	12

Tableau B.1 - Résultats quantitatifs des expériences d'activation de la protéine α GlyD. Le tableau regroupe les concentrations des réactifs et produits des réactions de réductolyse de l'AdoMet et de formation du radical glycinyne et fait apparaître le taux d'incorporation du deutérium dans la 5'-désoxyadénosine. Trx = thiorédoxine ; Trr = thiorédoxine réductase ; ND : non déterminé ; — : valeur inaccessible.

La conclusion principale de ces expériences d'activation avec la protéine α GlyD est que le transfert du radical de Ado \bullet à la glycine 681 est direct, bien que l'incorporation de deutérium dans la 5'-désoxyadénosine ne soit que partielle. Il semble d'ailleurs que l'utilisation du système réducteur physiologique de la protéine β permette d'augmenter le pourcentage de deutération atteint par réduction chimique du centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ de l'activase. Dans l'expérience d'activation en conditions stœchiométriques, il se forme environ une mole de 5'-désoxyadénosine par mole de centre fer-soufre réduit, en accord avec la stœchiométrie établie pour ce type de réaction (Padovani 2001a). Le transfert de radical ne s'effectue pas de manière optimale, puisque la quantité de radical GlyD \bullet ne représente que 42% de celle du centre $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ compétent pour la réductolyse de l'AdoMet. De manière cohérente, la quantité d'AdoD produite correspond à celle du radical GlyD \bullet . Par contre dans l'expérience d'activation catalytique, il se forme deux à trois fois moins d'AdoD que de radical glycinyle deutéré. Enfin, les quantités de méthionine et de 5'-désoxyadénosine sont relativement proches, et le meilleur pourcentage de deutération a été obtenu lorsque du DTT est inclus dans le mélange d'activation.

B.I.2.b - Deuxième étude

Les protéines α surexprimées puis purifiées à partir de cultures en milieu minimum sans complémentation en zinc sont généralement déficientes en zinc et présentent donc une sensibilité accrue vis-à-vis de la protéolyse (chapitre I). Il est possible que l'étude précédente ait été menée avec une protéine α GlyD partiellement tronquée. Une nouvelle préparation de protéine α GlyD a donc été obtenue dans des conditions de contrôle en zinc de manière à évaluer le taux d'incorporation de deutérium dans la 5'-désoxyadénosine lorsque l'activation est réalisée avec une protéine intacte.

◆ Préparation de la protéine α GlyD

Le protocole général de surexpression et de purification de la protéine α GlyD ne diffère pas de celui employé précédemment. Le milieu M9 et le tampon d'extraction sont

complémentés en zinc comme indiqué dans la partie Matériels et Méthodes.

❖ *Caractérisation structurale de la protéine α GlyD*

Dans un premier temps l'intégrité structurale de la protéine α GlyD a été vérifiée par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le spectre obtenu est présenté sur la figure B.8.

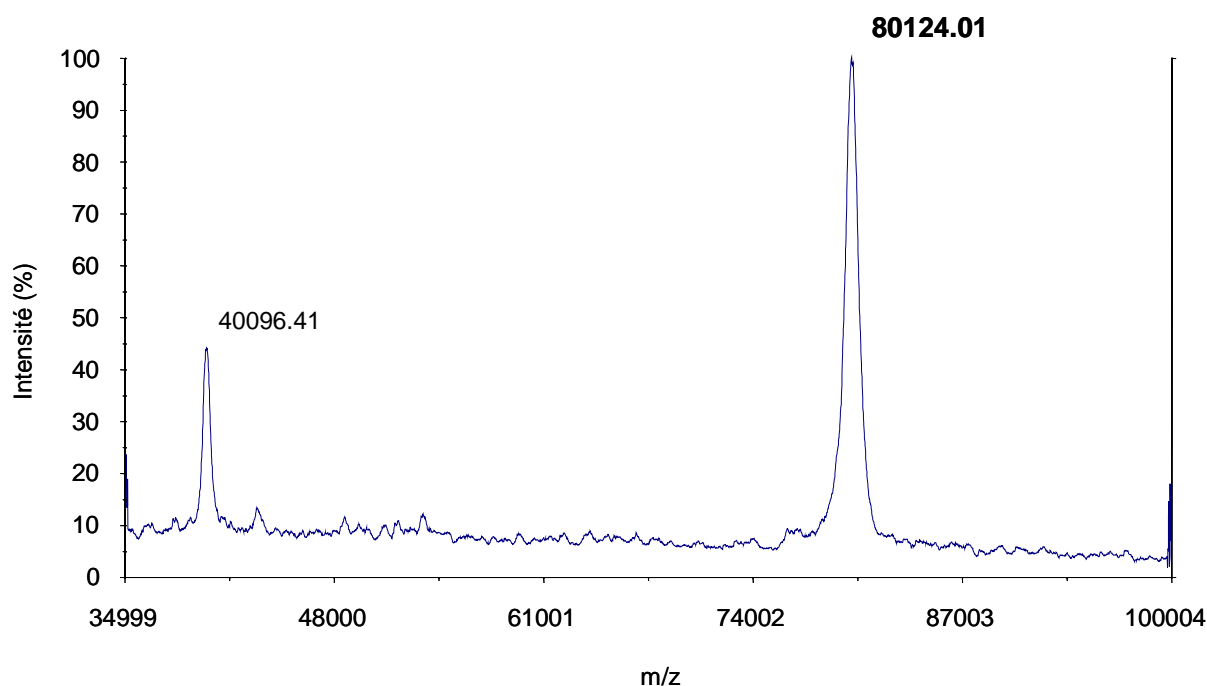


Figure B.8 - Spectre de masse MALDI-TOF de la protéine α GlyD. La protéine a été préparée dans des conditions d'enrichissement en zinc. Le pic dont la valeur de m/z est notée en gras correspond à l'espèce ionique $[M+H]^+$ où M représente la molécule de protéine α monomérique.

Comme le montre la figure B.8 la protéine α GlyD est intacte. L'incorporation de deutérium dans la protéine α GlyD est suggérée par l'obtention d'une masse de 80124 Da supérieure aux valeurs obtenues avec différentes préparations de protéines α sauvages non marquées, généralement inférieures à 80000 Da. Pour évaluer le taux d'incorporation de la glycine deutérée dans la chaîne polypeptidique, une analyse de la protéine α GlyD par spectrométrie de masse électrospray a été entreprise. Le spectre obtenu est présenté sur la figure B.9.

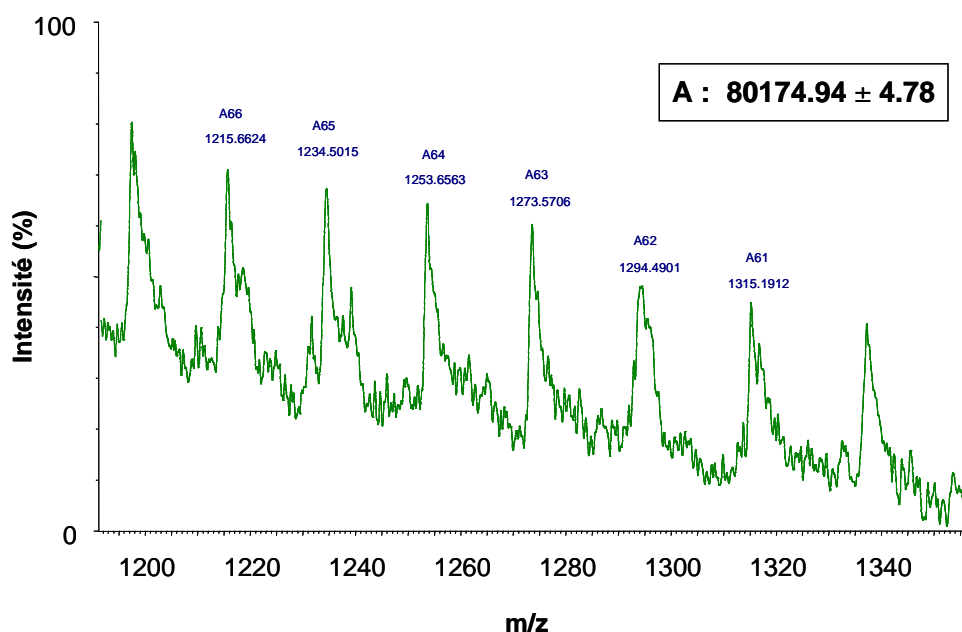


Figure B.9 – Spectre de masse électrospray brut de la protéine α GlyD obtenu en conditions dénaturantes. La masse calculée de la protéine est indiquée sur le spectre.

La protéine α comporte 56 glycines dans sa séquence. La masse théorique de la protéine α étant égale à 80023 Da, une incorporation exhaustive de (^2H - ^2H)-glycine dans la chaîne polypeptidique se traduit par une augmentation de 112 unités de la masse théorique. De manière inattendue, la masse de la protéine α GlyD est supérieure de 40 unités à cette valeur maximale égale à 80135 Da. Dans les conditions expérimentales utilisées le zinc est dissocié de la protéine et n'intervient donc pas dans le calcul de la masse, comme l'a montré l'analyse d'une préparation de protéine α sauvage métallée. L'hypothèse selon laquelle le deutérium apporté par la (^2H - ^2H)-glycine serait incorporé non seulement dans les glycines, mais également dans d'autres acides aminés de la protéine a ensuite été examinée. Pour cela les fragments issus de la trypsinolyse de la protéine α GlyD et d'une protéine α non marquée ont été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Les spectres correspondants sont présentés sur la figure B.10.

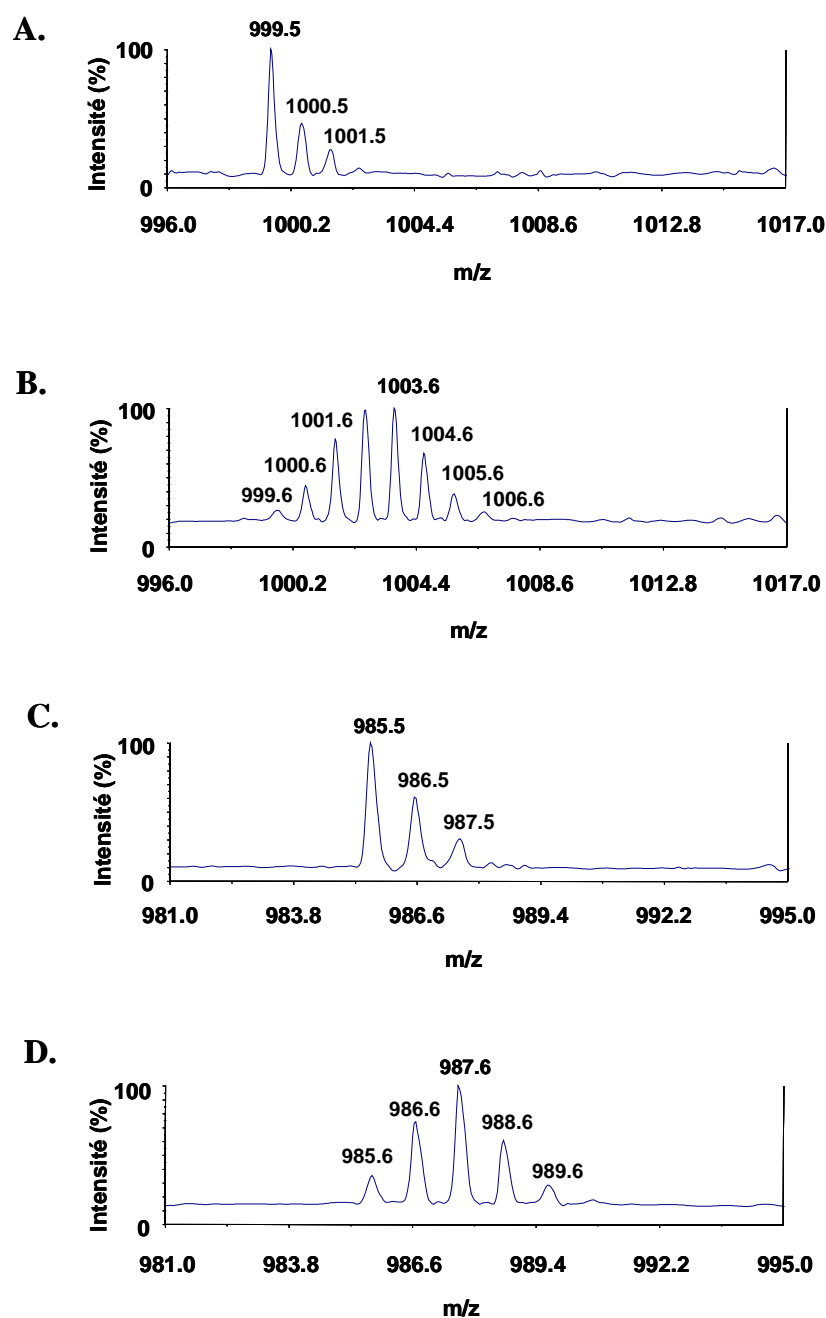


Figure B.10 – Spectres de masse MALDI-TOF de deux peptides issus de la trypsinolyse des protéines α et α GlyD. La figure rassemble les spectres d'un peptide contenant une glycine, issu d'un traitement par la trypsine de la protéine α (A.) ou de la protéine α GlyD (B.), et d'un autre peptide ne contenant aucune glycine, issu du traitement par la trypsine de la protéine α (C.) ou de la protéine α GlyD (D.). La protéine α sauvage ou α GlyD (125 μ g) a été incubée à 37°C pendant 48 h dans du tampon Tris 50 mM pH 8,5 avec du DTT (40 mM), du SDS (0,05%) et de la trypsine (2,5 μ g) avant l'analyse.

Si l'incorporation de deutérium attendue dans la protéine α GlyD était complète, c'est-à-dire si chacune des glycines possédait deux atomes de deutérium sur le carbone α , les

massifs isotopiques d'un même peptide issu de la trypsinolyse de la protéine α non deutérée et de la protéine α GlyD devraient simplement être décalés de deux unités de m/z . Or les massifs obtenus avec la protéine α GlyD présentent davantage de pics que ceux issus de l'analyse de la protéine α . L'un des peptides est partiellement hydrogéné sur la glycine qu'il contient (spectre B) et le peptide dépourvu de glycine contient du deutérium (spectre D). Ces analyses montrent clairement que les glycines ne sont pas deutérées de manière exhaustive et qu'une partie du deutérium est incorporée dans d'autres acides aminés.

◆ Activation de la protéine α GlyD

L'activation de la protéine α GlyD a été menée en conditions catalytiques en utilisant le système réducteur enzymatique de la protéine β en présence de DTT (5 mM) comme précédemment. Plusieurs tubes RPE sont préparés de manière à obtenir une cinétique de formation du radical glycinyle représentée sur la figure B.11.

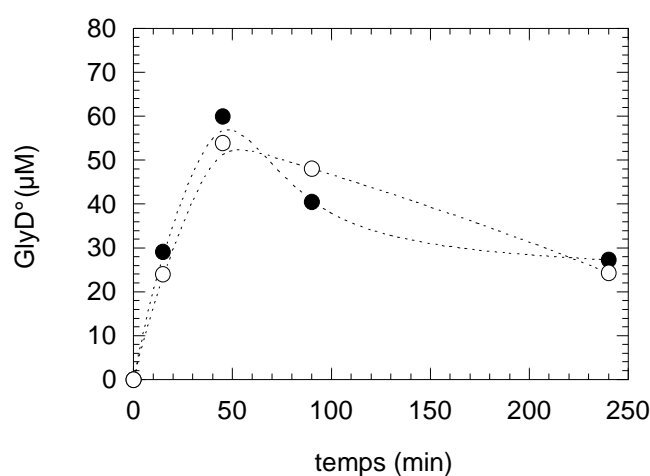


Figure B.11 - Cinétique de formation du radical glycinyle de la protéine α GlyD.

La protéine α GlyD (150 μ M) a été mélangée dans la boîte à gants avec la protéine β (100 μ M, symboles pleins ou 10 μ M, symboles vides), du DTT (5 mM), du NADPH (2,5 mM), de la flavodoxine (10 μ M) et de la flavodoxine réductase (11,5 μ M) dans du tampon Tris-HCl 100 mM pH 8, KCl 50 mM. La réaction a été initiée par l'ajout de 1,5 mM de SAM. Aux temps indiqués 200 μ L de solution sont congelés et la formation du radical glycinyle est analysée par spectroscopie de RPE.

La figure B.11 montre que la concentration de radical GlyD• augmente jusqu'à 45

min de réaction puis diminue progressivement. En accord avec le fait que la protéine β est une activase, les concentrations maximales de radical glycinyle atteintes en présence de quantités quasi stœchiométriques ou catalytiques de protéine β sont comparables. Les signaux du radical glycinyle observés par spectroscopie de RPE sont tout à fait similaires à celui de la figure B.4 (B). L'obtention d'un singulet confirme la deutération de la protéine α GlyD sur les glycines. En calculant des spectres de différence avec des quantités croissantes de radical glycinyle non deutéré, il est possible d'estimer la proportion de radical non deutéré présente dans le mélange. La quantité de radical GlyH \bullet représente ainsi au maximum 20% de la quantité totale de radical glycinyle détectée.

◆ *Analyse isotopique de la 5'-désoxyadénosine*

Purification de la 5'-désoxyadénosine

La 5'-désoxyadénosine formée lors du processus d'activation est purifiée par CLHP après décongélation des tubes RPE comme indiqué précédemment. La production de 5'-désoxyadénosine au cours du temps est illustrée sur la figure B.12.

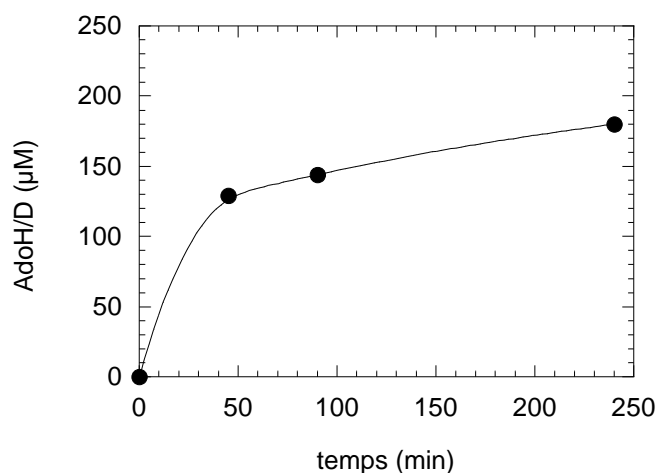


Figure B.12 - Cinétique de formation de la 5'-désoxyadénosine lors de l'activation catalytique de la protéine α GlyD. La 5'-désoxyadénosine a été purifiée par CLHP et quantifiée en utilisant la gamme étalon de la figure B.5.

Détermination du pourcentage de deutération

La 5'-désoxyadénosine est ensuite analysée par spectrométrie de masse électrospray. L'évolution du pourcentage de deutération de la 5'-désoxyadénosine au cours du temps est présentée sur la figure B.13.

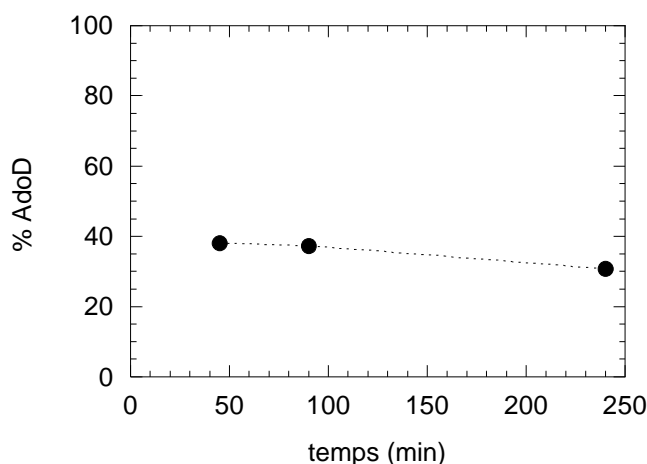


Figure B.13 - Cinétique d'incorporation du deutérium dans la 5'-désoxyadénosine lors de l'activation catalytique de la protéine α GlyD. Le pourcentage de deutération a été obtenu à partir des spectres de masse électrospray de la 5'-désoxyadénosine purifiée.

Cette étude confirme le caractère direct du transfert de radical de Ado^\bullet à la glycine 681 de la protéine α . La figure B.13 montre que le pourcentage de deutération de la 5'-désoxyadénosine est proche de 40%. Ce taux d'incorporation est similaire à ceux déterminés lors des expériences d'activation catalytique menées avec la première préparation de protéine α GlyD. Nous pouvons avancer deux hypothèses exclusives quant à l'origine de la deutération incomplète de la 5'-désoxyadénosine. Il est d'abord tout à fait possible que la protéine α GlyD ne soit que partiellement deutérée sur la glycine 681. Alternativement, les réactions de réductolyse de la SAM et d'oxydation de la glycine par le radical Ado^\bullet pourraient être réversibles, ce qui autoriserait des transferts de deutérium entre la 5'-désoxyadénosine et la SAM. De manière à tester cette deuxième proposition, la protéine α GlyD a été activée en présence d'une quantité limitée de SAM. La SAM a été purifiée par CLHP puis analysée par spectrométrie de masse électrospray. Aucune incorporation de deutérium dans la SAM n'a été

détectée dans ces conditions. Ceci suggère fortement que l'incorporation incomplète de deutérium dans la 5'-désoxyadénosine formée lors de la réaction d'activation de la protéine α GlyD résulte du caractère partiel de la deutération de la glycine 681 en position *pro-S*. Cette conclusion est en accord avec les résultats issus de l'étude par spectrométrie de masse de la protéine α GlyD trypsinolysée (figure B.10).

B.I.3 - DTT, zinc et formation du radical glycinyle

B.I.3.a - Influence du DTT

Les préparations de protéine α contenant plus de 0,75 atome de zinc par monomère présentent une faible activité CTP réductase en absence de DTT. Ceci suggère que ces protéines peuvent acquérir un radical glycinyle en absence de DTT. Afin de vérifier cette hypothèse, la protéine α a été activée avec le système flavodoxine en présence et en absence de DTT. Les cinétiques de formation du radical glycinyle et de 5'-désoxyadénosine sont présentées sur la figure B.14.

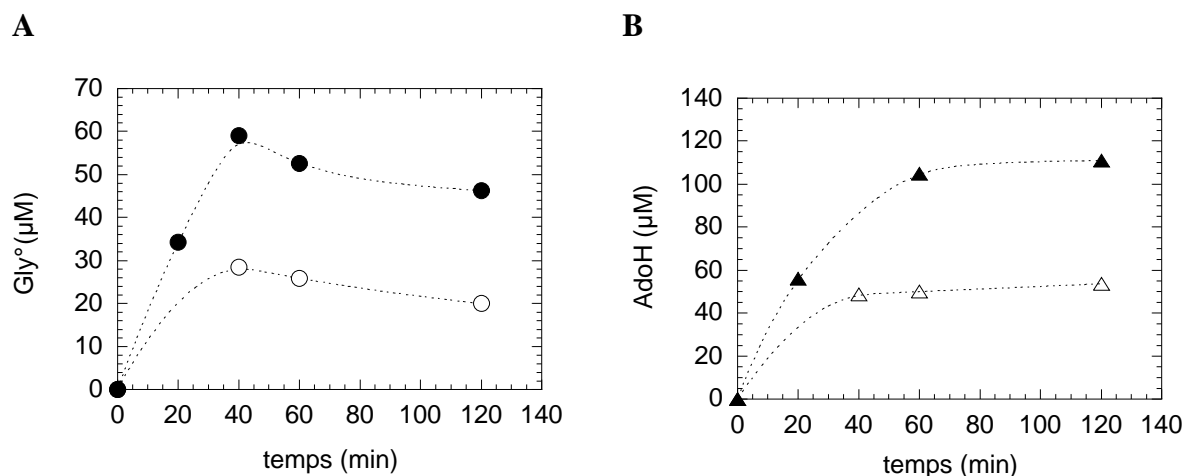


Figure B.14 - Effet du DTT sur les cinétiques d'activation de la protéine α . La protéine α (122 μ M) a été mélangée dans la boîte à gants avec la protéine β (12 μ M), du NADPH (2,5 mM), de la flavodoxine (10 μ M), de la flavodoxine réductase (20 μ M) dans du tampon Tris-HCl 100 mM pH 8, KCl 50 mM en présence (symboles pleins) ou en absence (symboles vides) de DTT (5 mM). La réaction a été initiée par l'ajout de 1,5 mM de SAM. Des échantillons (200 μ L) ont été prélevés aux temps indiqués et traités d'après les protocoles décrits dans la partie Matériels et Méthodes de manière à obtenir les quantités de Gly \bullet (A) et d'AdoH (B) formées.

En absence de DTT le radical glycinyle se forme effectivement ; la quantité maximale produite dans les conditions de la figure B.14 représente environ 50% de la quantité produite en présence de DTT. Dans les deux cas la concentration en radical Gly \bullet diminue progressivement après avoir atteint un maximum vers 40 minutes de réaction. En présence comme en absence de DTT la formation du radical glycinyle s'accompagne de la production de 5'-désoxyadénosine. Un plateau est atteint en fin de réaction et il se forme deux fois plus d'AdoH en présence qu'en absence de DTT. Le DTT n'est donc pas essentiel à l'introduction du radical glycinyle dans la protéine α .

B.I.3.b - Influence du zinc

L'activation de plusieurs autres préparations de protéine α a été étudiée en absence et en présence de DTT. Il se forme, en moyenne, respectivement 0,16 et 0,4 Gly \bullet par monomère de protéine α en absence et en présence de DTT. Une dispersion importante des valeurs autour de la moyenne apparaît clairement en absence de DTT, puisque la quantité de radical Gly \bullet par monomère varie de 0,03 à 0,3. Nous avons pu déterminer que cette variabilité est liée à des différences de contenu en zinc entre les différentes préparations. La figure B.15 montre la courbe obtenue lorsque le rapport Gly \bullet / α est porté en fonction du rapport Zn/ α .

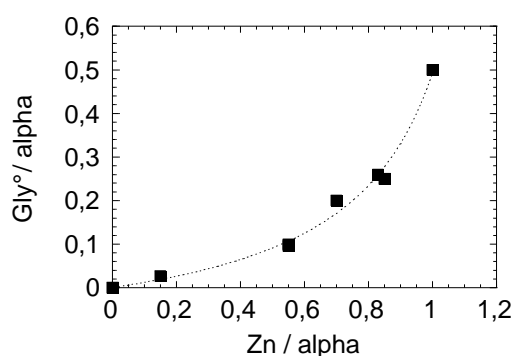


Figure B.15 - Corrélation entre le taux d'occupation du site métallique de la protéine α par le zinc et la quantité de radical glycinyle formé en absence de DTT. Toutes les protéines α utilisées pour obtenir la corrélation sont intactes ; certaines préparations ont été traitées par le TPEN au préalable. Les deux points extrêmes sont obtenus par extrapolation.

En absence de DTT, plus la protéine α contient de zinc spécifiquement lié au site métallique, plus la quantité maximale de radical glycinyle détectée par spectroscopie de RPE est élevée. En présence de DTT, cette quantité ne dépasse jamais 0,4 radical par monomère de protéine α , en accord avec les résultats établis antérieurement (Padovani 2001a). Nous n'avons pas pu préparer la protéine α sous forme entièrement démétaillée ; cependant l'extrapolation de la courbe pour un rapport Zn/ α nul suggère que l'apoprotéine α ne peut acquérir le radical glycinyle et est donc inactive en absence de DTT.

C - Stabilité du radical glycinyle

Le DTT n'est pas indispensable à l'introduction du radical glycinyle dans la protéine α . En absence de DTT, la quantité de radical formée est fonction de la quantité de zinc présent dans le site métallique de l'enzyme. Les cinétiques de formation du radical Gly \bullet menées en présence ou en absence de DTT montrent que la quantité de radical détectée par RPE augmente jusqu'à un maximum puis diminue progressivement pour tendre vers une valeur variable. La disparition partielle du radical glycinyle soulève ainsi la question de sa stabilité. Ce point a été abordé par l'examen de quelques facteurs exerçant un effet stabilisant ou déstabilisant sur le radical glycinyle.

C.I - Taux d'incorporation du radical Gly \bullet dans la protéine α

Indépendamment de l'observation d'une diminution de la quantité de radical glycinyle détectée au cours du temps, il semble d'après les analyses par spectroscopie de RPE qu'il se forme au maximum 0,4 radical Gly \bullet par monomère de protéine α en présence de DTT, c'est-à-dire environ un radical par dimère. Ce phénomène pourrait résulter d'un problème d'efficacité de transfert du radical Ado \bullet à la glycine 681 dans les conditions *in vitro* de la réaction d'activation. Il pourrait également s'agir d'une propriété intrinsèque du système RNR empêchant la radicalisation de l'une des chaînes polypeptidiques du dimère α_2 suite à l'introduction du radical dans l'autre monomère. Alternativement le radical glycinyle pourrait

être formé dans chacune des sous-unités mais subir une déstabilisation d'origine inconnue dans l'un des monomères et ainsi disparaître de ce dernier. Par l'analyse des cinétiques d'activation de la protéine α , il est possible de déterminer si le taux d'incorporation du radical Gly \bullet évalué par RPE traduit l'efficacité de transfert du radical Ado \bullet . Le profil des cinétiques d'activation obtenues avec des préparations de protéines α intactes est rappelé sur la figure C.1.

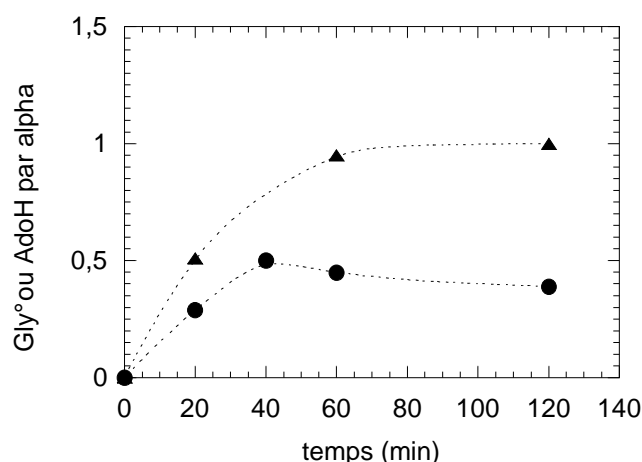


Figure C.1 - Profil général des cinétiques d'activation de la protéine α par le système flavodoxine en présence de DTT. Les courbes représentent l'évolution moyenne du nombre d'équivalents de radical glycinyle (ronds) et de 5'-désoxyadénosine (triangles) formés par monomère de protéine α au cours du temps d'après l'étude de plusieurs préparations de protéines α intactes.

Toutes les cinétiques d'activation de la protéine α montrent que la production de 5'-désoxyadénosine atteint un plateau au niveau duquel le rapport AdoH/ α est approximativement égal à 1. D'autre part la formation d'AdoH est négligeable lorsque la glycine 681 est remplacée par une alanine (paragraphe B.I.1) ; ceci signifie que toute production d'AdoH au cours de l'activation de la protéine α par le système flavodoxine résulte de la radicalisation de la glycine 681. De ces résultats nous pouvons déduire que lors de la réaction d'activation le radical glycinyle est introduit dans chacune des deux sous-unités de l'enzyme ; le taux maximal d'incorporation du radical Gly \bullet dans la protéine α déterminé

par RPE n'est que de 50% en raison de la disparition du radical dans l'une des deux sous-unités du dimère α_2 . Ainsi la quantité réelle de radical Gly \bullet formée au cours de l'activation ne peut être obtenue par l'analyse de la réaction par spectroscopie de RPE mais est accessible par quantification de la 5'-désoxyadénosine produite.

C.II - Influence de quelques facteurs sur la stabilité du radical Gly \bullet

La stabilité du radical glycinyle formé en présence ou en absence de DTT et détecté par RPE n'est pas parfaite en conditions *in vitro* puisque la quantité de radical diminue au cours du temps (figure B.14 (A.)). Nous avons pu établir que le système enzymatique NADPH : thiorédoxine : thiorédoxine réductase et l'ATP exercent des effets opposés sur la stabilité du radical Gly \bullet . L'influence de la mutation de certains acides aminés a également été étudiée.

C.II.1 - Effet du système thiorédoxine

Les cinétiques d'activation de la protéine α présentées sur la figure C.2 ont été réalisées en présence et en absence de quantités catalytiques de thiorédoxine et de thiorédoxine réductase. La protéine α GlyD a été utilisée afin d'accéder au taux d'incorporation du deutérium dans la 5'-désoxyadénosine produite. Le système thiorédoxine stimule légèrement la production du radical glycinyle, puisque son ajout au mélange d'activation provoque une augmentation de 25% de la quantité de 5'-désoxyadénosine produite après 2 h de réaction. Toutefois le système enzymatique exerce également un effet stabilisant sur le radical glycinyle : en fin de cinétique les quantités de radical GlyD \bullet détectées par RPE en absence et en présence du système thiorédoxine sont respectivement égales à 2,6 et 7,5 μ M. Le taux d'incorporation du deutérium dans la 5'-désoxyadénosine n'est pas modifié par la présence du système thiorédoxine et est similaire à celui déterminé en présence de DTT (figure (B.13)). Le système thiorédoxine en quantités stœchiométriques avec la protéine α stabilise également le radical glycinyle. Le DTT utilisé à des concentrations de l'ordre du millimolaire ne semble pas posséder cette propriété (figure (B.11)).

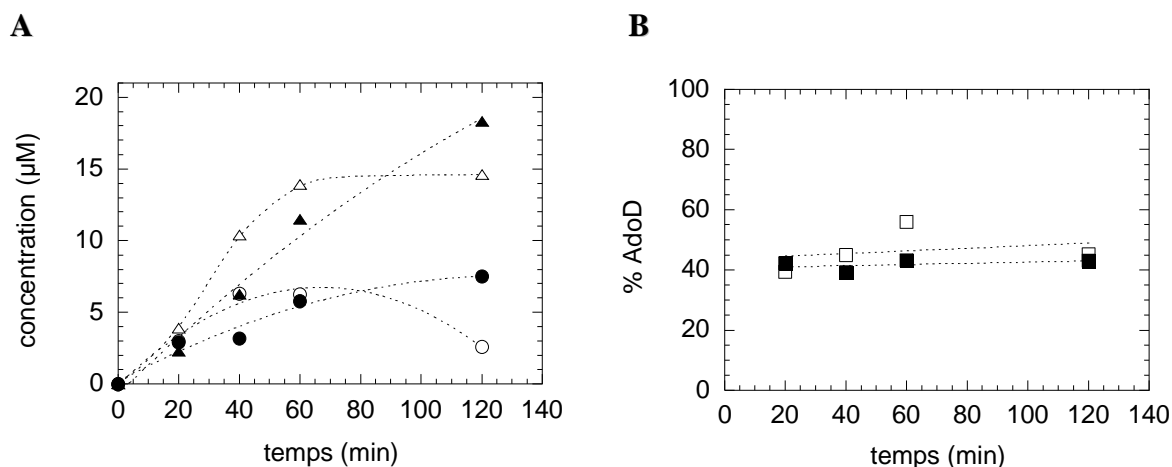


Figure C.2 - Effet du système thiorédoxine sur l'activation de la protéine α GlyD (A) et taux d'incorporation du deutérium dans la 5'-désoxyadénosine (B). La protéine α GlyD (100 μ M) a été mélangée dans la boîte à gants dans du tampon Tris-HCl 100 mM pH 8, KCl 50 mM avec la protéine β (5 μ M), du NADPH (2,5 mM), de la flavodoxine (3,5 μ M), de la flavodoxine réductase (3,7 μ M) en absence (symboles vides) ou en présence (symboles pleins) de thiorédoxine (10 μ M) et de thiorédoxine réductase (1,5 μ M). La réaction a été initiée par l'ajout de SAM (1,5 mM). Des échantillons (200 μ L) ont été prélevés aux temps indiqués et traités d'après les protocoles décrits dans la partie Matériels et Méthodes de manière à obtenir les quantités de GlyD \cdot (ronds) et de 5'-désoxyadénosine (triangles) formées ainsi que le pourcentage de deutération de la 5'-désoxyadénosine.

C.II.2 - Effet de l'ATP

Les cinétiques d'activation de la protéine α en absence et en présence d'ATP sont présentées sur la figure C.3. Tout au long de la cinétique, le seul radical détecté par spectroscopie de RPE lorsque l'activation est menée en présence d'ATP est la forme semiquinone de la flavodoxine réduite. Une quantité importante d'AdoH est cependant produite ; après 2h de réaction il s'est formé plus de 2 équivalents d'AdoH par monomère de protéine α et aucun plateau n'est observé. Le radical glycinyne formé est donc fortement déstabilisé en présence de l'effecteur allostérique qu'est l'ATP et probablement régénéré de manière continue par le système flavodoxine.

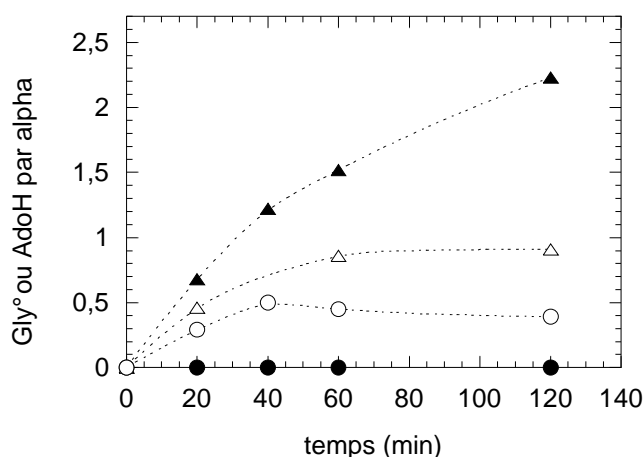


Figure C.3 - Effet de l'ATP sur l'activation de la protéine α . La protéine α (122 μ M) a été mélangée dans la boîte à gants dans du tampon Tris-HCl 100 mM pH 8, KCl 50 mM avec la protéine β (12 μ M), du NADPH (2,5 mM), de la flavodoxine (10 μ M), de la flavodoxine réductase (20 μ M) et du DTT (5 mM) en présence (symboles pleins) ou en absence (symboles vides) d'ATP (2,5 mM). La réaction a été initiée par l'ajout de 1,5 mM de SAM. Des échantillons (200 μ L) ont été prélevés aux temps indiqués et traités d'après les protocoles décrits dans la partie Matériels et Méthodes de manière à obtenir les quantités de Gly• (ronds) et d'AdoH (triangles) formées.

C.II.3 - Effet des mutations

Les mutants α C680A, α C644A et α C662A ne présentent aucune activité CTP réductase détectable (chapitres I et II). Nous avons donc voulu savoir s'ils acquièrent un radical glycinyle au cours de la réaction d'activation et si tel est le cas caractériser le radical formé en terme de stabilité. Pour cela la formation du radical glycinyle et de 5'-désoxyadénosine a été suivie au cours de la réaction d'activation par le système flavodoxine.

C.II.3.a - Etude du mutant α C680A

La préparation et la caractérisation structurale de la protéine α C680A a été décrite au paragraphe A.I.1. Les cinétiques d'activation du mutant et d'une protéine α sauvage sont présentées sur la figure C.4.

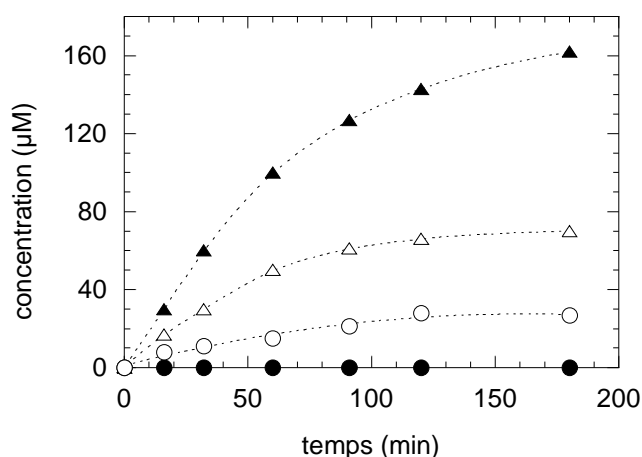


Figure C.4 - Cinétique d'activation des protéines α C680A et α sauvage.

La protéine α (50 μ M, symboles vides) ou α C680A (50 μ M, symboles pleins) a été mélangée dans la boîte à gants dans du tampon Tris-HCl 100 mM pH 8, KCl 50 mM avec la protéine β (50 μ M), du NADPH (2,5 mM), de la thiorédoxine (3 μ M), de la thiorédoxine réductase (1,5 μ M), de la flavodoxine (6 μ M) et de la flavodoxine réductase (4,6 μ M). La réaction a été initiée par l'ajout de SAM (1,5 mM). Des échantillons (200 μ L) ont été prélevés aux temps indiqués et traités d'après les protocoles décrits dans la partie Matériels et Méthodes de manière à obtenir les quantités de Gly• (ronds) et d'AdoH (triangles) formées.

Aucun radical glycinyle n'est détecté par spectroscopie de RPE lorsque la protéine α C680A est placée dans les conditions de la figure C.4. En présence du mutant la protéine β présente une activité SAM réductase élevée : en fin de cinétique il s'est formé environ trois équivalents d'AdoH par monomère de protéine α C680A sans qu'un plateau soit atteint. Ces résultats analogues à ceux obtenus avec la protéine α sauvage activée en présence d'ATP suggèrent que le radical glycinyle introduit dans le mutant est instable et continuellement régénéré. Afin de vérifier cette hypothèse, la réaction d'activation a ensuite été réalisée avec la protéine α C680AGlyD, dont les glycines sont deutérées sur le carbone α .

La protéine α C680AGlyD a été surexprimée en aérobiose, dans du milieu M9 complété en glucose, FeSO_4 /citrate, MgSO_4 , vitamine B1, ZnCl_2 et (^2H , ^2H)-glycine et inoculé à 1‰ avec une préculture réalisée en milieu LB. La protéine a ensuite été purifiée par chromatographie sur support hydrophobe (nouveau protocole) comme indiqué dans la partie

Matériels et Méthodes. L'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF montre que la protéine est tronquée en aval de la glycine 681 de la même manière que son équivalent non deutéré. La figure C.5 présente la cinétique d'activation de la protéine α C680AglyD.

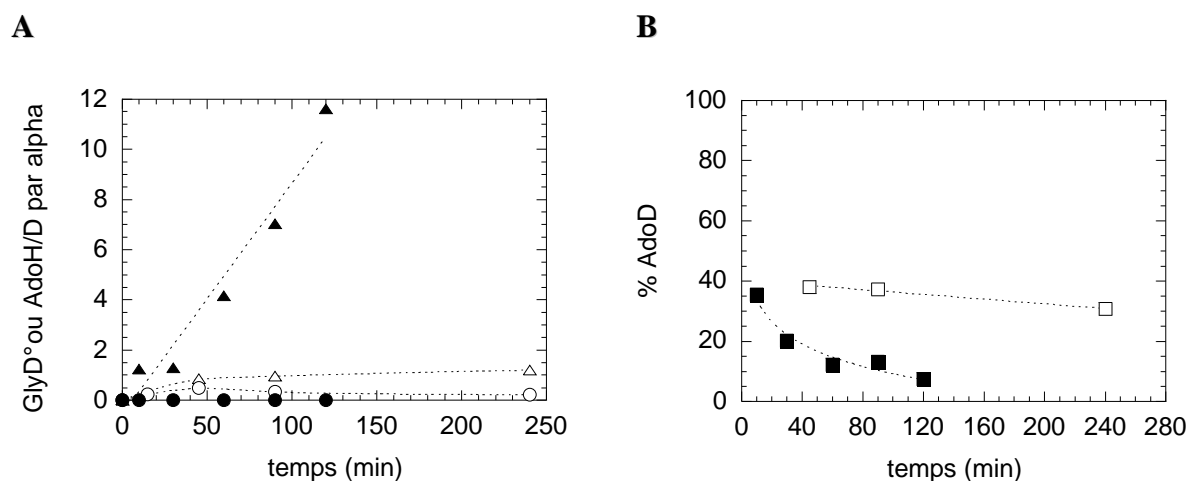


Figure C.5 - Cinétique d'activation de la protéine α C680AglyD (A) et taux d'incorporation du deutérium dans la 5'-désoxyadénosine (B). La protéine α GlyD (150 μ M, symboles vides) ou α C680AglyD (150 μ M, symboles pleins) a été mélangée dans la boîte à gants dans du tampon Tris-HCl 100 mM pH 8, KCl 50 mM avec la protéine β (100 μ M), du NADPH (2,5 mM), de la flavodoxine (10 μ M), de la flavodoxine réductase (11,5 μ M) et du DTT (5 mM). La réaction a été initiée par l'ajout de SAM (1,5 mM). Des échantillons (200 μ L) ont été prélevés aux temps indiqués et traités d'après les protocoles décrits dans la partie Matériels et Méthodes de manière à obtenir les quantités de GlyD[•] (ronds) et de 5'-désoxyadénosine (triangles) formées ainsi que le pourcentage de deutération de la 5'-désoxyadénosine.

La réaction d'activation menée avec le mutant α C680AglyD s'accompagne d'une production très importante de 5'-désoxyadénosine. L'observation d'une incorporation de deutérium dans la 5'-désoxyadénosine montre que le radical glycinyle a effectivement été produit. Le taux d'incorporation de deutérium, bien que comparable en début de réaction à celui obtenu avec la protéine α sauvage deutérée, diminue régulièrement au cours de la cinétique pour atteindre 7,5% après 2 h de réaction. L'enrichissement progressif de la 5'-désoxyadénosine en hydrogène suggère que le radical glycinyle formé est rapidement réduit

par une source d'atome d'hydrogène présente dans le milieu puis régénéré *via* le système flavodoxine. L'enchaînement des cycles d'oxydation-réduction de la glycine 681 conduit ainsi à l'augmentation au cours du temps du nombre d'équivalents de 5'-désoxyadénosine formés par monomère de protéine α C680AglyD.

C.II.3.b - Etude des mutants α C644A et α C662A

Les mutants α C644A et α C662A préparés sous forme métallée et majoritairement intacte ne présentent pas d'activité CTP réductase (chapitre I). La formation du radical glycinyle et de 5'-désoxyadénosine a été suivie au cours de la réaction d'activation des deux protéines. Les cinétiques obtenues sont présentées sur la figure C.6.

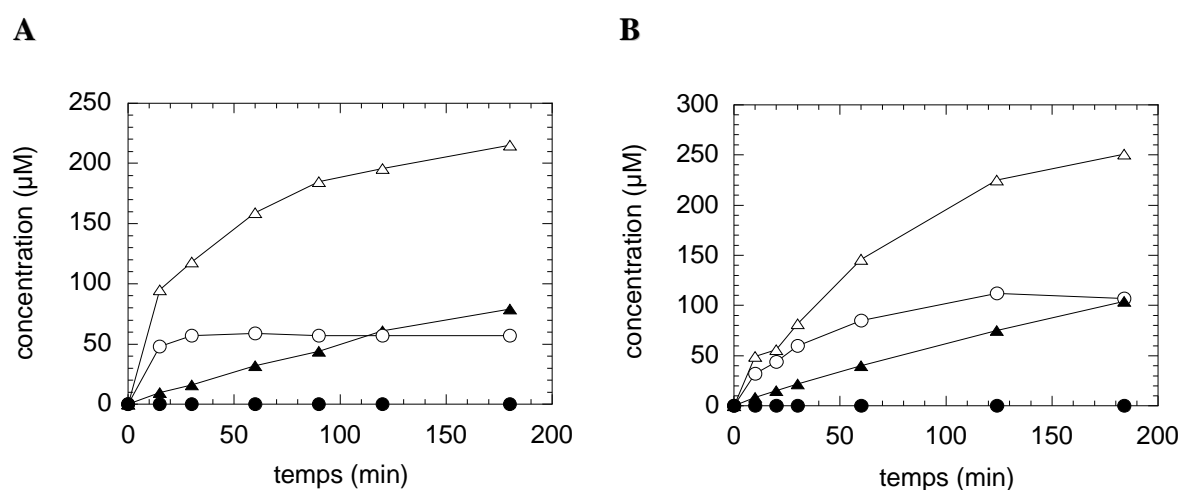


Figure C.6 - Cinétiques d'activation des protéines α C644A, α C662A et α sauvage. La protéine α sauvage (A et B, symboles vides), α C644A (A, symboles pleins) ou α C662A (B, symboles pleins) (200 μ M) a été mélangée dans la boîte à gants dans du tampon Tris-HCl 100 mM pH 8, KCl 50 mM avec la protéine β (200 μ M), du NADPH (2,5 mM), de la thiorédoxine (10 μ M), de la thiorédoxine réductase (5 μ M), de la flavodoxine (20 μ M) et de la flavodoxine réductase (12,5 μ M). La réaction a été initiée par l'ajout de SAM (1,5 mM). Des échantillons (200 μ L) ont été prélevés aux temps indiqués et traités d'après les protocoles décrits dans la partie Matériels et Méthodes de manière à obtenir les quantités de Gly• (ronds) et d'AdoH (triangles) formées. La préparation de protéine α sauvage utilisée dans l'expérience B est différente de celle utilisée dans l'expérience A.

Dans les conditions de la figure C.6, la protéine α sauvage acquiert un radical glycinyle stable après 3 h de réaction. Par contre aucun des deux mutants α C644A et α C662A ne se trouve radicalisé en fin d'expérience : la seule espèce radicalaire détectable dans les tubes RPE correspondants est le radical semiquinone de la flavodoxine. Les protéines α C644A et α C662A présentent cependant une activité AdoMet réductase non négligeable par rapport à celle de la protéine sauvage (10 à 20% en début de cinétique). La production d'AdoH est plus lente dans le cas des mutants et augmente linéairement tout au long de la cinétique. Puisque dans des conditions similaires la protéine β seule est incapable d'effectuer la réductolyse de l'AdoMet (figure B.2), la formation d'AdoH détectée est bien dépendante de la présence des protéines α C644A et α C662A. Le radical glycinyle est probablement formé mais ici encore n'est pas suffisamment stable pour être détecté. Le profil des cinétiques est toutefois différent de celui obtenu avec le mutant α C680A. En effet en fin de réaction il s'est formé moins d'un équivalent d'AdoH par monomère de protéine α C644A ou α C662A, sans qu'un plateau soit atteint ; il n'est pas possible en l'absence de données complémentaires de préciser si le radical Gly \bullet apparu transitoirement est régénéré par le système flavodoxine. Ces résultats montrent que la présence de zinc dans le site métallique ne suffit pas à stabiliser le radical glycinyle, puisque ce dernier n'est pas détecté lors de l'activation des mutants α C644A et α C662A, qui contiennent pourtant près d'un atome de zinc par monomère. La stabilité du radical Gly \bullet dépend donc également de l'environnement du métal, imposé par la nature et le nombre des ligands notamment.

D – Discussion

D.I – Formation et stabilité du radical glycinyle

En utilisant une préparation de protéine α dont les glycines sont deutérées sur le carbone α , nous avons pu montrer que le transfert de radical de Ado \bullet à la glycine 681 de la RNR anaérobie d'*E. coli* s'effectue de manière directe. L'hypothèse selon laquelle les cystéines du site métallique de la protéine α seraient impliquées dans le transfert de radical

entre la protéine β et la protéine α , proposée par Andersson *et al.* (2000), peut donc être écartée. Ce résultat suggère que le complexe [4Fe-4S]-SAM de l'activase et le résidu Gly681 de la réductase se situent à proximité spatiale l'un de l'autre.

Avec une préparation de protéine α GlyD intacte, le taux d'incorporation de deutérium dans la 5'-désoxyadénosine ne dépasse pas 40%. Pour expliquer ce résultat, nous avons envisagé l'hypothèse selon laquelle les réactions de réductolyse de la SAM et d'oxydation de la glycine par le radical Ado^\bullet pourraient être réversibles, conduisant à l'obtention d'un mélange de 5'-désoxadénosine protonée et deutérée. De manière à tester cette proposition, la protéine α GlyD a été activée par le système flavodoxine en présence de quantités limitées de SAM. En effet, si un équilibre entre les réactions de réductolyse de la SAM et d'oxydation de la glycine 681 existe, la SAM doit progressivement s'enrichir en deutérium. Aucune incorporation de deutérium dans la SAM n'a été mise en évidence par spectrométrie de masse. Le caractère partiel de l'incorporation de deutérium dans la 5'-désoxyadénosine s'explique donc très probablement par le fait que dans une partie des protéines α GlyD la glycine 681 est partiellement ou totalement hydrogénée, comme l'ont suggéré les analyses par spectrométrie de masse. De même, le fait que le signal RPE du radical glycinyle obtenu lors de l'activation de la protéine α GlyD soit un singulet indique que l'espèce majoritairement formée est le radical GlyD^\bullet , mais une certaine proportion de radical glycinyle hydrogéné (GlyH^\bullet) est également présente, indiquant que la glycine 681 n'est pas uniformément deutérée dans tous les polypeptides. La protéine α GlyD contient également du deutérium incorporé dans d'autres acides aminés ; ceci ne remet pas en cause le fait que le transfert de radical de Ado^\bullet à la glycine 681 s'effectue de manière directe. En effet nous pouvons considérer que la majeure partie du deutérium apporté se situe au niveau des résidus glycines de la protéine ; de plus l'intervention éventuelle d'un acide aminé intermédiaire apparaît peu probable compte tenu des caractéristiques du transfert de radical établies dans ce chapitre. Un transfert direct du radical Ado^\bullet à la glycine 734 de la pyruvate formiate-lyase d'*E. coli*, une protéine à radical glycinyle remarquablement similaire à la RNR anaérobie, a été mis en évidence par une méthode similaire (Frey 1994). Le taux d'incorporation du

deutérium dans la 5'-désoxyadénosine a été estimé à $51-52 \pm 5\%$.

Il a été montré précédemment qu'au cours de la réaction d'activation de la protéine α menée en présence du système flavodoxine, la production d'AdoH associée à l'activité SAM réductase de la protéine β est négligeable lorsque la glycine 681 de la protéine α est remplacée par une alanine. L'expérience a été reproduite avec une préparation de protéine α correctement métallée et intacte, confirmant l'existence d'un couplage thermodynamique entre les réactions de réduction du centre $[4Fe-4S]^{2+}$ de la protéine β par le système flavodoxine et d'oxydation de la glycine 681. Toute production d'AdoH au cours de l'activation de la protéine α par le système flavodoxine résulte de la radicalisation de la glycine 681. La quantification de la production d'AdoH permet donc d'accéder à la quantité réelle de radical Gly \cdot formé au cours de l'activation catalytique de la protéine α . Avec les nouvelles préparations de protéine α , la production de 5'-désoxyadénosine atteint un plateau correspondant à la formation d'un équivalent d'AdoH par monomère de protéine α . Avec des préparations de protéines α déficientes en zinc et partiellement ou totalement protéolysées (en amont de la glycine 681), le rapport AdoH/ α est toujours inférieur à 1 ; cette observation s'explique par le fait que la protéine β ne catalyse pas la réductolyse de la SAM lorsque la protéine α associée ne possède pas la glycine 681 essentielle.

Il a été confirmé dans ce travail que la quantité maximale de radical glycinyle détectée par spectroscopie de RPE ne dépasse jamais un équivalent par dimère de protéine α et non par monomère. Puisque la 5'-désoxyadénosine est formée en proportions stoechiométriques par rapport à la protéine α , nous en déduisons que lors de la réaction d'activation le radical glycinyle est en réalité formé dans chacune des deux sous-unités de l'enzyme, mais qu'il disparaît de l'un des monomères. Nous pouvons donc proposer un modèle dans lequel le radical introduit dans l'un des monomères provoque une très forte déstabilisation du radical glycinyle de l'autre monomère. Cette déstabilisation doit nécessairement se traduire par une réduction du radical par un partenaire non identifié ; la

modification conformationnelle probablement induite est telle que la glycine 681 régénérée n'est plus accessible au radical Ado^\bullet , ou que la formation du complexe entre l'activase et la réductase n'est plus permise. En effet au terme de la cinétique d'activation catalytique de la protéine α la production d'AdoH cesse au moment où un équivalent d'AdoH par monomère de protéine α a été formé, indiquant que le radical glycinyle déstabilisé n'est pas régénéré. La pyruvate formiate-lyase contient également dans sa forme activée un radical glycinyle stable par dimère (Unkrig 1989) ; cette observation n'a cependant pas été interprétée. En revanche la détermination très récente (Uppsten 2006) de la structure cristallographique d'un complexe entre les protéines R1 et R2 de la RNR de classe I de *S. typhimurium* à 4 Å a permis aux auteurs de proposer un modèle expliquant le phénomène dit de « half-site reactivity » également observé dans ce système enzymatique (Sjöberg 1987 ; Erickson 2000). Dans la structure le dimère de R2 (le système générateur de radicaux) forme un complexe asymétrique avec l'un des deux monomères de protéine R1 (la réductase) ; selon les auteurs le dimère de R2 pourrait alternativement interagir avec l'un puis l'autre des monomères de protéine R1, permettant l'initiation de la réduction du substrat au sein de l'un des deux sites actifs. La disparition sélective du radical Gly^\bullet de l'un des monomères pourrait être une caractéristique commune aux enzymes à radical glycinyle, généralement homodimériques.

Le problème de la stabilité du radical glycinyle devient ainsi un paramètre clé du système. De fait la mesure de l'activité SAM réductase a permis de mettre en évidence une instabilité du radical Gly^\bullet dans certaines conditions. Par exemple, le mutant $\alpha\text{C680AglyD}$ acquiert bien un radical glycinyle de manière transitoire, comme l'a montré l'incorporation de deutérium dans la 5'-désoxyadénosine produite lors de la réaction d'activation, mais contrairement à la situation observée avec l'enzyme sauvage, ce radical est réduit par une source d'atome d'hydrogène. La glycine 681 régénérée demeure accessible au radical Ado^\bullet et est à nouveau oxydée en présence du système catalytique flavodoxine. L'enchaînement des cycles d'oxydation-réduction de la glycine se traduit par une production continue de 5'-désoxyadénosine (cessant en théorie lorsque le NADPH est entièrement consommé). Il est possible que la déstabilisation du radical Gly^\bullet soit due à la mutation de la cystéine 680

adjacente au site radicalaire. Toutefois l'absence des 22 acides aminés C-terminaux du mutant α C680AGlyD pourrait être totalement ou en partie responsable de l'instabilité du radical glycinyle, ce dernier étant peut-être plus accessible au solvant dans le mutant tronqué que dans l'enzyme intacte. Le fait que le radical glycinyle puisse être régénéré dans la protéine α C680A est peut-être également lié à la particularité structurale du mutant tel qu'il a été obtenu.

L'ATP provoque de même une déstabilisation du radical glycinyle probablement formé puis continuellement réduit et régénéré. Ce résultat est intéressant car il établit l'existence d'une communication entre le site allostérique dit d'activité ou pyrimidique fixant l'ATP, situé à l'interface entre les deux monomères, et la boucle C-terminale portant le site glycine radicalaire.

Enfin, la production d'AdoH observée lors de l'activation catalytique des mutants α C644A et α C662A métallés et intacts, bien que lente, est significative et indique là aussi la formation probable d'un radical Gly \cdot insuffisamment stable pour être détecté. Une manière de confirmer cette hypothèse serait d'étudier l'incorporation de deutérium dans la 5'-désoxyadénosine produite lors de l'activation des mutants α C644AGlyD et α C662AGlyD, possédant des glycines deutérées sur le carbone α . Cette méthode nécessiterait la construction de vecteurs adaptés à la surexpression des mutants en milieu minimum, donc en aérobiose.

D.II - Rôle du DTT

Les études précédentes ont suggéré que le DTT nécessaire à l'activation de la protéine α a pour fonction de réduire un pont disulfure non localisé de la réductase. Nous avons montré que les cystéines C550 et C680, situées à proximité l'une de l'autre d'après la structure cristallographique de l'enzyme du bactériophage T4 et idéalement placées pour contrôler l'accès au site actif, ne sont pas engagées dans un pont disulfure.

En réalité il est apparu que l'état redox de différentes préparations de protéine α est variable et que le nombre de ponts disulfures équivalents par monomère de protéine α est

inversement proportionnel à la quantité de zinc spécifiquement associé au site métallique $\text{Zn}(\text{Cys})_4$. Les résultats peuvent être expliqués par la formation de deux ponts disulfures par monomère d'apoprotéine α résultant de l'oxydation des quatre cystéines du site métallique. Il semble que les protéines α obtenues en utilisant l'ancien protocole de purification étaient systématiquement déficientes en zinc et contenaient en moyenne un pont disulfure par monomère. Cette proposition est en accord avec le fait que les anciennes préparations présentaient des activités enzymatiques 2 à 5 fois plus faibles que celles obtenues au cours de ce travail.

Un résultat important de cette étude est que le DTT n'est pas essentiel à l'introduction du radical glycinyle dans la protéine α . En absence de DTT, le taux d'incorporation du radical glycinyle est d'autant plus élevé que la protéine α contient de zinc. De plus, les quantités maximales de radical Gly^\bullet détectées par RPE en absence et en présence de DTT correspondent respectivement à 0,3 et 0,4 équivalent par monomère de protéine α (quantités obtenues lorsque $\text{Zn}/\alpha = 0,85$) ; par extrapolation, la protéine α stabilise 0,5 radical Gly^\bullet par monomère aussi bien en absence qu'en présence de DTT lorsque le site métallique est saturé ($\text{Zn}/\alpha = 1$). Le DTT, en réduisant les ponts disulfures présents dans une population de protéines α non métallées, favorise probablement une incorporation de zinc exogène dans le site métallique ; il en résulte une augmentation modérée de la quantité de radical glycinyle introduit dans la réductase si celle-ci est légèrement déficiente en zinc.

L'influence du DTT sur l'activité RNR est beaucoup plus marquée. Les nouvelles préparations de protéine α contenant au minimum 0,75 atome de zinc par monomère présentent en absence de DTT une activité CTP réductase faible mais mesurable, dont la valeur moyenne est de $50 \text{ nmoles min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. En présence de concentrations millimolaires de DTT, l'activité CTP réductase des protéines est 10 à 20 fois plus élevée qu'en absence de DTT. En admettant que ces préparations stabilisent respectivement 0,3 et 0,4 radical glycinyle par monomère en absence et en présence de DTT dans les conditions du test d'activité, il semble qu'il n'existe pas de relation de proportionnalité entre la quantité de radical glycinyle stabilisé et l'activité RNR. La stimulation importante de l'activité CTP réductase ne semble

pas pouvoir provenir de la seule augmentation du taux d'incorporation du radical glycinyle par le DTT. Ces résultats suggèrent que le DTT est impliqué dans un événement consécutif à la formation du radical glycinyle ; la manière dont le dithiol stimule l'activité enzymatique reste à déterminer.

Conclusion

générale

Les organismes anaérobies stricts ou facultatifs utilisent un système multienzymatique complexe pour réduire les ribonucléotides en leurs désoxyribonucléotides correspondants selon un mécanisme radicalaire. La fixation du substrat s'effectue sur la réductase, une protéine homodimérique contenant dans sa forme activée un radical glycinyne essentiel à l'activité enzymatique. La formation du radical glycinyne est catalysée par une autre protéine, appelée activase, qui produit des radicaux 5'-désoxyadénosyles oxydants grâce à la combinaison entre un centre [4Fe-4S], la S-adénosylméthionine et une source d'électrons. Les précédentes études réalisées sur la RNR anaérobie d'*E. coli* ont principalement porté sur l'activase ou protéine β . En particulier les méthodes spectroscopiques ont été mises à profit pour caractériser le centre fer-soufre de la protéine et déterminer la nature de l'espèce compétente pour la réductolyse de la SAM. Il est apparu en 2003 avec la structure cristallographique de l'enzyme du bactériophage T4 que la réductase ou protéine α pourrait elle-même être une métalloprotéine. La découverte d'un site métallique tétraédrique, dont l'importance pour l'activité enzymatique a été suggérée par des expériences de mutagenèse dirigée, a favorisé l'orientation du projet de cette thèse, au cours de laquelle quelques-unes des propriétés structurales et fonctionnelles de la protéine α d'*E. coli* ont été étudiées.

Dans un premier temps nous avons déterminé que la protéine α d'*E. coli* est une protéine à zinc. La réductase fixe dans sa partie C-terminale un atome de zinc lié de manière tétraédrique à quatre cystéines conservées. En raison de la forte affinité de la protéine pour le zinc ($K_a = 5 \times 10^{17} \text{ M}^{-1}$ à 4°C et pH 8), la démétallation de l'enzyme est difficile même en présence de bons chélateurs. L'élimination du zinc conduit à une instabilité de la protéine et il n'a pas été possible d'isoler la forme apo. L'importance du zinc pour l'intégrité structurale est confirmée par l'existence d'un phénomène de protéolyse affectant les protéines déficientes en zinc sauvages ou mutées au niveau du site métallique. La coupure de la chaîne polypeptidique s'effectue en aval du site glycine radicalaire ; les protéines tronquées sont donc par définition inactives. La modification des conditions de purification de la protéine α a permis d'obtenir des préparations correctement métallées, intactes et présentant des activités CTP réductase

élevées, jamais atteintes auparavant au laboratoire. Certaines préparations sont partiellement réactivables par incubation avec une source de zinc en conditions réductrices. Ces résultats montrent que le zinc exerce un effet positif sur l'activité enzymatique, même si une véritable corrélation entre contenu en zinc et activité RNR n'a pu être établie du fait des problèmes de contamination en zinc liés à la mesure de l'activité CTP réductase. Les deux mutants α C644A et α C662A du site métallique sont inactifs bien qu'ils puissent être, dans certaines conditions, correctement métallés et intacts ; cette observation confirme la dépendance de l'activité enzymatique vis-à-vis du site métallique de la protéine α . D'après nos résultats le site $\text{Zn}(\text{Cys})_4$ n'est pas indispensable pour la fixation de la protéine β et ne constitue pas non plus un domaine de réponse au stress oxydant. Le site métallique semble avoir pour unique fonction de maintenir la structure de l'extrémité C-terminale de la protéine α , qui porte la glycine 681 essentielle à l'activité enzymatique. Nous pouvons remarquer que le site $\text{Zn}(\text{Cys})_4$ singularise les RNRs de classe III par rapport aux RNRs de classe I et II d'une part, et aux autres enzymes à radical glycinyle d'autre part, qui ne possèdent pas dans leur séquence les deux motifs CXXC caractéristiques. En particulier la comparaison des structures cristallographiques de la PFL, de la GDH et de la PFL2 montre que ces trois enzymes à radical Gly^\bullet possèdent des extrémités C-terminales très similaires ; la partie située en amont du site glycine radicalaire, très différente de celle de la RNR du bactériophage T4, est ainsi constituée d'une succession d'hélices α . Dans certaines séquences de RNRs de classe III, une histidine remplace l'une des cystéines d'un doublet CXXC ; dans d'autres, les positions relatives du site métallique et du site radicalaire présumés sont modifiées par rapport à celles invariablement observées dans le groupe rassemblant les RNRs du bactériophage T4 et d'*E. coli*. Il serait intéressant de déterminer si ces enzymes fixent effectivement le zinc et si le site métallique est nécessaire à la structure et/ou à l'activité enzymatique.

Dans la deuxième partie de ce travail nous avons cherché à localiser le pont disulfure de la protéine α , dont l'existence a été suggérée lors des précédentes expériences. Nous avons montré qu'en réalité l'état redox des protéines varie en fonction de la préparation considérée de manière inversement proportionnelle à la quantité de zinc présente dans le site métallique :

les cystéines du site métallique d'une protéine déficiente en zinc tendent à être oxydées en pont disulfure. Un milieu réducteur (présence de DTT) permet de régénérer les cystéines sous forme de thiolates aptes à chélater du zinc exogène et ainsi de réactiver la protéine. En réexaminant le processus d'activation de la protéine α , nous avons ensuite déterminé que le DTT n'est pas essentiel à l'introduction du radical glycinyle dans la réductase. En absence de DTT, le taux d'incorporation du radical Gly \bullet est d'autant plus élevé que la protéine α contient de zinc. Les nouvelles préparations de protéine α riches en zinc contiennent sensiblement la même quantité de radical glycinyle en absence et en présence de DTT, mais curieusement l'ajout de DTT dans le test d'activité RNR provoque la stimulation importante de l'activité CTP réductase par un mécanisme non élucidé. Il n'y a donc pas de corrélation entre la quantité de radical glycinyle stabilisé et l'activité RNR. Lors de la réaction d'activation, il se forme un radical Gly \bullet par monomère de protéine α ; du fait de la déstabilisation sélective du radical dans l'un des monomères, seul un radical glycinyle par dimère de protéine est détecté par spectroscopie de RPE. Le radical Gly \bullet déstabilisé n'est pas régénéré. Le système thioredoxine utilisé en quantités catalytiques ou stoechiométriques stabilise le radical glycinyle ; au contraire la mutation des cystéines du site métallique de la protéine α et l'ATP provoquent une déstabilisation complète du radical. Ces résultats montrent la sensibilité du radical glycinyle et soulignent l'importance du contrôle des radicaux par les protéines qui les mettent à profit. Ainsi l'activité enzymatique n'est pas nécessairement proportionnelle au degré de stabilisation d'un radical protéique essentiel à la réaction. Enfin nous avons montré par une technique de marquage isotopique de la protéine α que le transfert de radical de Ado \bullet à la glycine 681 s'effectue de manière directe. Le complexe [4Fe-4S]-SAM de l'activase et la glycine catalytique de la réductase se situent donc à proximité spatiale l'un de l'autre.

Dans ce travail le mécanisme de formation du radical glycinyle a été examiné. Etant donné les résultats relatifs à la fonction du DTT, un objectif pourrait être d'étudier les réactions consécutives à l'introduction du radical Gly \bullet , et en particulier la manière dont s'effectuent les transferts de radicaux entre la glycine 681, la cystéine 384 et le substrat. A ce

stade de l'étude de la RNR anaérobie d'*E. coli*, l'obtention d'une structure cristallographique du complexe entre les protéines α et β semble indispensable à la compréhension détaillée des interactions entre la réductase et l'activase à l'échelle atomique.

Références bibliographiques

- A -

- Åberg, A., Nordlund, P. and Eklund, H. (1993). "Unusual clustering of carboxyl side chains in the core of iron-free ribonucleotide reductase." Nature **361**(6409): 276-8.
- Andersson, M. E., Högbom, M., Rinaldo-Matthis, A., Andersson, K. K., Sjöberg, B.-M. and Nordlund, P. (1999). "The Crystal Structure of an Azide Complex of the Diferrous R2 Subunit of Ribonucleotide Reductase Displays a Novel Carboxylate Shift with Important Mechanistic Implications for Diiron-Catalyzed Oxygen Activation." J. Am. Chem. Soc. **121**(11).
- Andersson, J., Westman, M., Sahlin, M. and Sjöberg, B. M. (2000). "Cysteines involved in radical generation and catalysis of class III anaerobic ribonucleotide reductase. A protein engineering study of bacteriophage T4 NrdD." J Biol Chem **275**(26): 19449-55.
- Andersson, J., Bodevin, S., Westman, M., Sahlin, M. and Sjöberg, B. M. (2001). "Two active site asparagines are essential for the reaction mechanism of the class III anaerobic ribonucleotide reductase from bacteriophage T4." J Biol Chem **276**(44): 40457-63.
- Arnold, F. H. and Zhang, J. H. (1994). "Metal-mediated protein stabilization." Trends Biotechnol **12**(5): 189-92.
- Atanassova, A. and Zamble, D. B. (2005). "Escherichia coli HypA is a zinc metalloprotein with a weak affinity for nickel." J Bacteriol **187**(14): 4689-97.

- B -

- Bae, J. B., Park, J. H., Hahn, M. Y., Kim, M. S. and Roe, J. H. (2004). "Redox-dependent changes in RsrA, an anti-sigma factor in Streptomyces coelicolor: zinc release and disulfide bond formation." J Mol Biol **335**(2): 425-35.
- Baldwin, J., Krebs, C., Ley, B. A., Edmondson, D. E., Huynh, B. H. and Bollinger, J. M., Jr. (2000). "Mechanism of Rapid Electron Transfer during Oxygen Activation in the R2 Subunit of Escherichia coli Ribonucleotide Reductase. 1. Evidence for a Transient Tryptophan Radical." J. Am. Chem. Soc. **122**(49): 12195-12206.
- Barber, J. (2003). "Photosystem II: the engine of life." Q Rev Biophys **36**(1): 71-89.

- Barry, B. A. and Babcock, G. T. (1987). "Tyrosine radicals are involved in the photosynthetic oxygen-evolving system." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(20): 7099-103.
- Becker, A., Fritz-Wolf, K., Kabsch, W., Knappe, J., Schultz, S. and Volker Wagner, A. F. (1999). "Structure and mechanism of the glycyl radical enzyme pyruvate formate-lyase." Nat Struct Biol **6**(10): 969-75.
- Beller, H. R. and Spormann, A. M. (1999). "Substrate range of benzylsuccinate synthase from *Azoarcus* sp. strain T." FEMS Microbiol Lett **178**(1): 147-53.
- Berkovitch, F., Nicolet, Y., Wan, J. T., Jarrett, J. T. and Drennan, C. L. (2004). "Crystal structure of biotin synthase, an S-adenosylmethionine-dependent radical enzyme." Science **303**(5654): 76-9.
- Berry, M. B. and Phillips, G. N., Jr. (1998). "Crystal structures of *Bacillus stearothermophilus* adenylate kinase with bound Ap5A, Mg²⁺ Ap5A, and Mn²⁺ Ap5A reveal an intermediate lid position and six coordinate octahedral geometry for bound Mg²⁺ and Mn²⁺." Proteins **32**(3): 276-88.
- Bianchi, V., Eliasson, R., Fontecave, M., Mulliez, E., Hoover, D. M., Matthews, R. G. and Reichard, P. (1993). "Flavodoxin is required for the activation of the anaerobic ribonucleotide reductase." Biochem Biophys Res Commun **197**(2): 792-7.
- Bianchi, V., Haggard-Ljungquist, E., Pontis, E. and Reichard, P. (1995). "Interruption of the ferredoxin (flavodoxin) NADP⁺ oxidoreductase gene of *Escherichia coli* does not affect anaerobic growth but increases sensitivity to paraquat." J Bacteriol **177**(15): 4528-31.
- Björklund, S., Skog, S., Tribukait, B. and Thelander, L. (1990). "S-phase-specific expression of mammalian ribonucleotide reductase R1 and R2 subunit mRNAs." Biochemistry **29**(23): 5452-8.
- Bollinger, J. M., Jr., Edmondson, D. E., Huynh, B. H., Filley, J., Norton, J. R. and Stubbe, J. (1991). "Mechanism of assembly of the tyrosyl radical-dinuclear iron cluster cofactor of ribonucleotide reductase." Science **253**(5017): 292-8.

- Bollinger, J. M., Jr., Krebs, C., Vicol, A., Chen, S., Ley, B. A., Edmondson, D. E. and Huynh, B. H. (1998). "Engineering the Diiron Site of Escherichia coli Ribonucleotide Reductase Protein R2 to Accumulate an Intermediate Similar to Hperoxo, the Putative Peroxodiiron(III) Complex from the Methane Monooxygenase Catalytic Cycle." J Am Chem Soc **120**(5): 1094-1095.
- Boussac, A. and Etienne, A. L. (1984). "Midpoint potential of signal II (slow) in Tris-washed photosystem-II particles." Biochim Biophys Acta **766**(3): 576-581.
- Buckel, W. and Golding, B. T. (1998). "Radical species in the catalytic pathways of enzymes from anaerobes". FEMS Microbiol Rev **22**(5): 523-541.

- C -

- Chen, D., Walsby, C., Hoffman, B. M. and Frey, P. A. (2003). "Coordination and mechanism of reversible cleavage of S-adenosylmethionine by the [4Fe-4S] center in lysine 2,3-aminomutase." J Am Chem Soc **125**(39): 11788-9.
- Cho, K.-B., Himo, F., Graslund, A. and Siegbahn, P. E. M. (2001). "The Substrate Reaction Mechanism of Class III Anaerobic Ribonucleotide Reductase." J. Phys. Chem. B **105**(27): 6445-6452.
- Collet, J. F., D'Souza, J. C., Jakob, U. and Bardwell, J. C. (2003). "Thioredoxin 2, an oxidative stress-induced protein, contains a high affinity zinc binding site." J Biol Chem **278**(46): 45325-32.
- Coschigano, P. W., Wehrman, T. S. and Young, L. Y. (1998). "Identification and analysis of genes involved in anaerobic toluene metabolism by strain T1: putative role of a glycine free radical." Appl Environ Microbiol **64**(5): 1650-6.
- Cosper, N. J., Booker, S. J., Ruzicka, F., Frey, P. A. and Scott, R. A. (2000). "Direct FeS cluster involvement in generation of a radical in lysine 2,3-aminomutase." Biochemistry **39**(51): 15668-73.
- Cosper, M. M., Jameson, G. N., Davydov, R., Eidsness, M. K., Hoffman, B. M., Huynh, B. H. and Johnson, M. K. (2002). "The [4Fe-4S](2+) cluster in reconstituted biotin synthase binds S-adenosyl-L-methionine." J Am Chem Soc **124**(47): 14006-7.

Coves, J., Laulhere, J. P. and Fontecave, M. (1997). "The role of exogenous iron in the activation of ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*." J Biol Inorg Chem **2**: 418-426.

Dauter, Z., Wilson, K. S., Sieker, L. C., Moulis, J. M. and Meyer, J. (1996). "Zinc- and iron-rubredoxins from *Clostridium pasteurianum* at atomic resolution: a high-precision model of a ZnS₄ coordination unit in a protein." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(17): 8836-40.

- D -

Duboc-Toia, C., Hassan, A. K., Mulliez, E., Ollagnier-de Choudens, S., Fontecave, M., Leutwein, C. and Heider, J. (2003). "Very high-field EPR study of glycy radical enzymes." J Am Chem Soc **125**(1): 38-9.

- E -

Eklund, H. and Fontecave, M. (1999). "Glycyl radical enzymes: a conservative structural basis for radicals." Structure **7**(11): R257-62.

Eklund, H., Uhlin, U., Farnegardh, M., Logan, D. T. and Nordlund, P. (2001). "Structure and function of the radical enzyme ribonucleotide reductase." Prog Biophys Mol Biol **77**(3): 177-268.

Eliasson, R., Fontecave, M., Jornvall, H., Krook, M., Pontis, E. and Reichard, P. (1990). "The anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase from *Escherichia coli* requires S-adenosylmethionine as a cofactor." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(9): 3314-8.

Eliasson, R., Pontis, E., Fontecave, M., Gerez, C., Harder, J., Jornvall, H., Krook, M. and Reichard, P. (1992). "Characterization of components of the anaerobic ribonucleotide reductase system from *Escherichia coli*." J Biol Chem **267**(35): 25541-7.

Eliasson, R., Pontis, E., Eckstein, F. and Reichard, P. (1994). "Interactions of 2'-modified azido- and haloanalogs of deoxycytidine 5'-triphosphate with the anaerobic ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*." J Biol Chem **269**(42): 26116-20.

- Eliasson, R., Reichard, P., Mulliez, E., Ollagnier, S., Fontecave, M., Liepinsh, E. and Otting, G. (1995). "The mechanism of the anaerobic Escherichia coli ribonucleotide reductase investigated with nuclear magnetic resonance spectroscopy." Biochem Biophys Res Commun **214**(1): 28-35.
- Erickson, H. K. (2000). "Formation of the cystine between cysteine 225 and cysteine 462 from ribonucleoside diphosphate reductase is kinetically competent." Biochemistry **39**(31): 9241-9250.
- Eriksson, M., Uhlin, U., Ramaswamy, S., Ekberg, M., Regnstrom, K., Sjoberg, B. M. and Eklund, H. (1997). "Binding of allosteric effectors to ribonucleotide reductase protein R1: reduction of active-site cysteines promotes substrate binding." Structure **5**(8): 1077-92.
- F -**
- Finke, R. G. and Hay, B. P. (1984). "Thermolysis of adenosylcobalamin: a product, kinetic, and cobalt-carbon (C5') bond dissociation energy study." Inorg. Chem. **23**(20): 3041-3043.
- Finke, R. G. and Martin, B. D. (1990) "Coenzyme AdoB12 vs AdoB12.- homolytic Co-C cleavage following electron transfer: a rate enhancement greater than or equal to 10(12)." J Inorg Biochem **40**(1): 19-22.
- Firbank, S. J., Rogers, M. S., Wilmot, C. M., Dooley, D. M., Halcrow, M. A., Knowles, P. F., McPherson, M. J. and Phillips, S. E. (2001). "Crystal structure of the precursor of galactose oxidase: an unusual self-processing enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(23): 12932-7.
- Fontecave, M., Eliasson, R. and Reichard, P. (1989). "Oxygen-sensitive ribonucleoside triphosphate reductase is present in anaerobic Escherichia coli." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(7): 2147-51.
- Fontecave, M., Mulliez, E. and Logan, D. T. (2002). "Deoxyribonucleotide synthesis in anaerobic microorganisms: the class III ribonucleotide reductase." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **72**: 95-127.

- Frankel, A. D., Berg, J. M. and Pabo, C. O. (1987). "Metal-dependent folding of a single zinc finger from transcription factor IIIA." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(14): 4841-5.
- Frey, P. A. (1990). "Importance of organic radicals in enzymic cleavage of unactivated carbon-hydrogen bonds." Chem. Rev. **90**(7): 1343-1357.
- Frey, M., Rothe, M., Wagner, A. F. and Knappe, J. (1994). "Adenosylmethionine-dependent synthesis of the glycyl radical in pyruvate formate-lyase by abstraction of the glycine C-2 pro-S hydrogen atom. Studies of [2H]glycine-substituted enzyme and peptides homologous to the glycine 734 site." J Biol Chem **269**(17): 12432-7.
- Frey, P. A. and Booker, S. J. (2001a). "Radical mechanisms of S-adenosylmethionine-dependent enzymes." Adv Protein Chem **58**: 1-45.
- Frey, P. A. (2001b). "Radical mechanisms of enzymatic catalysis." Annu Rev Biochem **70**: 121-48.

- G -

- Gambarelli, S., Luttringer, F., Padovani, D., Mulliez, E. and Fontecave, M. (2005). "Activation of the anaerobic ribonucleotide reductase by S-adenosylmethionine." Chembiochem **6**(11): 1960-2.
- Garriga, X., Eliasson, R., Torrents, E., Jordan, A., Barbe, J., Gibert, I. and Reichard, P. (1996). "nrdD and nrdG genes are essential for strict anaerobic growth of Escherichia coli." Biochem Biophys Res Commun **229**(1): 189-92.
- Gerfen, G. J., Licht, S., Willems, J.-P., Hoffman, B. M. and Stubbe, J. (1996). "Electron Paramagnetic Resonance Investigations of a Kinetically Competent Intermediate Formed in Ribonucleotide Reduction: Evidence for a Thiyl Radical-Cob(II)alamin Interaction." J Am Chem Soc **118**(35): 8192-8197.
- Giedroc, D. P., Keating, K. M., Williams, K. R., Konigsberg, W. H. and Coleman, J. E. (1986). "Gene 32 protein, the single-stranded DNA binding protein from bacteriophage T4, is a zinc metalloprotein." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(22): 8452-6.

- Gilchrist, M. L., Jr., Ball, J. A., Randall, D. W. and Britt, R. D. (1995). "Proximity of the manganese cluster of photosystem II to the redox-active tyrosine YZ." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9545-9.
- Gomis-Ruth, F. X., Stocker, W., Huber, R., Zwilling, R. and Bode, W. (1993). "Refined 1.8 Å X-ray crystal structure of astacin, a zinc-endopeptidase from the crayfish *Astacus astacus* L. Structure determination, refinement, molecular structure and comparison with thermolysin." J Mol Biol **229**(4): 945-68.
- Good, M. and Vasak, M. (1986). "Spectroscopic properties of the cobalt(II)-substituted alpha-fragment of rabbit liver metallothionein." Biochemistry **25**(11): 3328-34.
- H -**
- Halpern, J., Kim, S. H. and Leung, T. W. (1984). "Cobalt-carbon bond dissociation energy of coenzyme B12." J. Am. Chem. Soc. **106**: 8317-8319.
- Hanas, J. S., Hazuda, D. J., Bogenhagen, D. F., Wu, F. Y. and Wu, C. W. (1983). "Xenopus transcription factor A requires zinc for binding to the 5 S RNA gene." J Biol Chem **258**(23): 14120-5.
- Hänzelmann, P. and Schindelin, H. (2004). "Crystal structure of the S-adenosylmethionine-dependent enzyme MoaA and its implications for molybdenum cofactor deficiency in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(35): 12870-5.
- Henshaw, T. F., Cheek, J. and Broderick, J. B. (2000). "The [4Fe-4S]¹⁺ Cluster of Pyruvate Formate-Lyase Activating Enzyme Generates the Glycyl Radical on Pyruvate Formate-Lyase: EPR-Detected Single Turnover." J Am Chem Soc **122**(34): 8331-8332.
- Himo, F. and Eriksson, L. A. (1998). "Catalytic Mechanism of Pyruvate Formate-Lyase (PFL). A Theoretical Study." J Am Chem Soc **120**(44): 11449-11455.
- Högbom, M., Galander, M., Andersson, M., Kolberg, M., Hofbauer, W., Lassmann, G., Nordlund, P. and Lendzian, F. (2003). "Displacement of the tyrosyl radical cofactor in ribonucleotide reductase obtained by single-crystal high-field EPR and 1.4-Å x-ray data." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(6): 3209-14.

Hunt, J. B., Neece, S. H. and Ginsburg, A. (1985). "The use of 4-(2-pyridylazo)resorcinol in studies of zinc release from *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase." Anal Biochem **146**: 150-157.

- I -

Ito, N., Phillips, S. E., Stevens, C., Ogel, Z. B., McPherson, M. J., Keen, J. N., Yadav, K. D. and Knowles, P. F. (1991). "Novel thioether bond revealed by a 1.7 Å crystal structure of galactose oxidase." Nature **350**(6313): 87-90.

- J -

Jakob, U., Eser, M. and Bardwell, J. C. (2000). "Redox switch of hsp33 has a novel zinc-binding motif." J Biol Chem **275**(49): 38302-10.

Johnson, J. M., Halsall, H. B. and Heineman, W. R. (1985). "Redox activation of galactose oxidase: thin-layer electrochemical study." Biochemistry **24**(7): 1579-1585.

Jordan, A. and Reichard, P. (1998). "Ribonucleotide reductases." Annu Rev Biochem **67**: 71-98.

- K -

Karthein, R., Dietz, R., Nastainczyk, W. and Ruf, H. H. (1988). "Higher oxidation states of prostaglandin H synthase. EPR study of a transient tyrosyl radical in the enzyme during the peroxidase reaction." Eur J Biochem **171**(1-2): 313-20.

King, D. S. and Reichard, P. (1995). "Mass spectrometric determination of the radical scission site in the anaerobic ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*." Biochem Biophys Res Commun **206**(2): 731-5.

Klug, A. and Schwabe, J. W. (1995). "Protein motifs 5. Zinc fingers." Faseb J **9**(8): 597-604.

Knappe, J. and Wagner, A. F. (2001). "Stable glycy radical from pyruvate formate-lyase and ribonucleotide reductase (III)." Adv Protein Chem **58**: 277-315.

- Krebs, C., Chen, S., Baldwin, J., Ley, B. A., Patel, U., Edmondson, D. E., Huynh, B. H. and Bollinger, J. M., Jr. (2000). "Mechanism of Rapid Electron Transfer during Oxygen Activation in the R2 Subunit of Escherichia coli Ribonucleotide Reductase. 2. Evidence for and Consequences of Blocked Electron Transfer in the W48F Variant." J Am Chem Soc **122**(49): 12207-12219.
- Krebs, C., Broderick, W. E., Henshaw, T. F., Broderick, J. B. and Huynh, B. H. (2002). "Coordination of adenosylmethionine to a unique iron site of the [4Fe-4S] of pyruvate formate-lyase activating enzyme: a Mossbauer spectroscopic study." J Am Chem Soc **124**(6): 912-3.
- Krieger, C. J., Roseboom, W., Albracht, S. P. and Spormann, A. M. (2001). "A stable organic free radical in anaerobic benzylsuccinate synthase of Azoarcus sp. strain T." J Biol Chem **276**(16): 12924-7.
- Krishna, S. S., Majumdar, I. and Grishin, N. V. (2003). "Structural classification of zinc fingers: survey and summary." Nucleic Acids Res **31**(2): 532-550.

- L -

- Landro, J. A. and Schimmel, P. (1993). "Metal-binding site in a class I tRNA synthetase localized to a cysteine cluster inserted into nucleotide-binding fold." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(6): 2261-5.
- Layer, G., Moser, J., Heinz, D. W., Jahn, D. and Schubert, W. D. (2003). "Crystal structure of coproporphyrinogen III oxidase reveals cofactor geometry of Radical SAM enzymes." Embo J **22**(23): 6214-24.
- Layer, G., Heinz, D. W., Jahn, D. and Schubert, W. D. (2004). "Structure and function of radical SAM enzymes." Curr Opin Chem Biol **8**(5): 468-476.
- Lehtio, L., Grossmann, J. G., Kokona, B., Fairman, R. and Goldman, A. (2006). "Crystal structure of a glycyl radical enzyme from Archaeoglobus fulgidus." J Mol Biol **357**(1): 221-35.
- Lepore, B. W., Ruzicka, F. J., Frey, P. A. and Ringe, D. (2005). "The x-ray crystal structure of lysine-2,3-aminomutase from Clostridium subterminale." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(39): 13819-24.

- Leuthner, B. and Heider, J. (1998). "A two-component system involved in regulation of anaerobic toluene metabolism in *Thauera aromatica*." FEMS Microbiol Lett **166**(1): 35-41.
- Leutwein, C. and Heider, J. (1999). "Anaerobic toluene-catabolic pathway in denitrifying *Thauera aromatica*: activation and beta-oxidation of the first intermediate, (R)-(+)-benzylsuccinate." Microbiology **145** (Pt 11): 3265-71.
- Licht, S., Gerfen, G. J. and Stubbe, J. (1996). "Thiyl radicals in ribonucleotide reductases." Science **271**(5248): 477-81.
- Logan, D. T., Su, X. D., Aberg, A., Regnstrom, K., Hajdu, J., Eklund, H. and Nordlund, P. (1996). "Crystal structure of reduced protein R2 of ribonucleotide reductase: the structural basis for oxygen activation at a dinuclear iron site." Structure **4**(9): 1053-64.
- Logan, D. T., Andersson, J., Sjoberg, B. M. and Nordlund, P. (1999). "A glycyl radical site in the crystal structure of a class III ribonucleotide reductase." Science **283**(5407): 1499-504.
- Logan, D. T., Mulliez, E., Larsson, K. M., Bodevin, S., Atta, M., Garnaud, P. E., Sjoberg, B. M. and Fontecave, M. (2003). "A metal-binding site in the catalytic subunit of anaerobic ribonucleotide reductase." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 3826-31.

- M -

- MacMurdo, V. L., Zheng, H. and Que, L., Jr. (2000). "Model for the Cofactor Formation Reaction of *E. Coli* Ribonucleotide Reductase. From a Diiron(II) Precursor to an FeIII/FeIV Species via a Peroxo Intermediate." Inorg. Chem. **39**(11): 2254-2255.
- Magnusson, O. T., Reed, G. H. and Frey, P. A. (2001). "Characterization of an allylic analogue of the 5'-deoxyadenosyl radical: an intermediate in the reaction of lysine 2,3-aminomutase." Biochemistry **40**(26): 7773-82.
- Matthews, J. M. and Sunde, M. (2002). "Zinc fingers--folds for many occasions." IUBMB Life **54**(6): 351-5.
- May, S. W. and Kuo, J. Y. (1978). "Preparation and properties of cobalt(II) rubredoxin." Biochemistry **17**(16): 3333-8.

- McCall, K. A., Huang, C. and Fierke, C. A. (2000). "Function and mechanism of zinc metalloenzymes." J Nutr **130**(5S Suppl): 1437S-46S.
- McCarthy, T. V. and Lindahl, T. (1985). "Methyl phosphotriesters in alkylated DNA are repaired by the Ada regulatory protein of E. coli." Nucleic Acids Res **13**(8): 2683-98.
- McIver, L., Leadbeater, C., Campopiano, D. J., Alexeev, D. and Baxter, R. L. (1998). "An investigation of flavoprotein redox partners." Biochem Soc Trans **26**(3): S271.
- Miller, J., McLachlan, A. D. and Klug, A. (1985). "Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes." Embo J **4**(6): 1609-14.
- Moenne-Loccoz, P., Baldwin, J., Ley, B. A., Loehr, T. M. and Bollinger, J. M., Jr. (1998). "O₂ activation by non-heme diiron proteins: identification of a symmetric μ -1,2-peroxide in a mutant of ribonucleotide reductase." Biochemistry **37**(42): 14659-63.
- Mulliez, E., Fontecave, M., Gaillard, J. and Reichard, P. (1993). "An iron-sulfur center and a free radical in the active anaerobic ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*." J Biol Chem **268**(4): 2296-9.
- Mulliez, E., Ollagnier, S., Fontecave, M., Eliasson, R. and Reichard, P. (1995). "Formate is the hydrogen donor for the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(19): 8759-62.
- Mulliez, E., Ollagnier-de Choudens, S., Meier, C., Cremonini, M., Luchinat, C., Trautwein, A. X. and Fontecave, M. (1999). "Iron-sulfur interconversions in the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*." J Biol Inorg Chem **4**(5): 614-20.
- Mulliez, E., Padovani, D., Atta, M., Alcouffe, C. and Fontecave, M. (2001). "Activation of class III ribonucleotide reductase by flavodoxin: a protein radical-driven electron transfer to the iron-sulfur center." Biochemistry **40**(12): 3730-6.
- Murzin, A. G., Brenner, S. E., Hubbard, T. and Chothia, C. (1995). "SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures." J Mol Biol **247**(4): 536-40.

Myers, L. C., Terranova, M. P., Nash, H. M., Markus, M. A. and Verdine, G. L. (1992). "Zinc binding by the methylation signaling domain of the Escherichia coli Ada protein." Biochemistry **31**(19): 4541-7.

Myers, L. C., Terranova, M. P., Ferentz, A. E., Wagner, G. and Verdine, G. L. (1993). "Repair of DNA methylphosphotriesters through a metalloactivated cysteine nucleophile." Science **261**(5125): 1164-7.

- N -

Nordlund, P., Sjoberg, B. M. and Eklund, H. (1990). "Three-dimensional structure of the free radical protein of ribonucleotide reductase." Nature **345**(6276): 593-8.

Nordlund, P. and Eklund, H. (1993). "Structure and function of the Escherichia coli ribonucleotide reductase protein R2." J Mol Biol **232**(1): 123-64.

- O -

O'Brien, J. R., Raynaud, C., Croux, C., Girbal, L., Soucaille, P. and Lanzilotta, W. N. (2004). "Insight into the mechanism of the B12-independent glycerol dehydratase from Clostridium butyricum: preliminary biochemical and structural characterization." Biochemistry **43**(16): 4635-45.

Olcott, M. C., Andersson, J. and Sjoberg, B. M. (1998). "Localization and characterization of two nucleotide-binding sites on the anaerobic ribonucleotide reductase from bacteriophage T4." J Biol Chem **273**(38): 24853-60.

Ollagnier, S., Mulliez, E., Gaillard, J., Eliasson, R., Fontecave, M. and Reichard, P. (1996). "The anaerobic Escherichia coli ribonucleotide reductase. Subunit structure and iron sulfur center." J Biol Chem **271**(16): 9410-6.

Ollagnier, S., Mulliez, E., Schmidt, P. P., Eliasson, R., Gaillard, J., Deronzier, C., Bergman, T., Graslund, A., Reichard, P. and Fontecave, M. (1997). "Activation of the anaerobic ribonucleotide reductase from Escherichia coli. The essential role of the iron-sulfur center for S-adenosylmethionine reduction." J Biol Chem **272**(39): 24216-23.

Ollagnier, S., Meier, C., Mulliez, E., Gaillard, J., Schuenemann, V., Trautwein, A., Mattioli, T., Lutz, M. and Fontecave, M. (1999). "Assembly of 2Fe-2S and 4Fe-4S clusters in the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*." J Am Chem Soc **121**(27): 6344-6350.

- P -

Padovani, D., Thomas, F., Trautwein, A. X., Mulliez, E. and Fontecave, M. (2001a). "Activation of class III ribonucleotide reductase from *E. coli*. The electron transfer from the iron-sulfur center to S-adenosylmethionine." Biochemistry **40**(23): 6713-9.

Padovani, D., Mulliez, E. and Fontecave, M. (2001b). "Activation of class III ribonucleotide reductase by thioredoxin." J Biol Chem **276**(13): 9587-9.

Padovani, D. (2002). "Centres FeS et catalyse rédox - Activation de la ribonucléotide réductase anaérobie en protéine radicalaire." Thèse de l'Université Joseph Fourier.

Pétillet, Y., Forest, E., Mathieu, I., Meyer, J. and Moulis, J. M. (1993). "Analysis, by electrospray ionization mass spectrometry, of several forms of *Clostridium pasteurianum* rubredoxin." Biochem J **296** (Pt 3): 657-61.

Poole, L. B., Karplus, P. A. and Claiborne, A. (2004). "Protein sulfenic acids in redox signaling." Annu Rev Pharmacol Toxicol **44**: 325-47.

- Q -

Que, L. and Dong, Y. (1996). "Modeling the Oxygen Activation Chemistry of Methane Monooxygenase and Ribonucleotide Reductase." Acc. Chem. Res. **29**(4): 190-196.

- R -

Raynaud, C., Sarcabal, P., Meynial-Salles, I., Croux, C. and Soucaille, P. (2003). "Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PD) operon of *Clostridium butyricum*." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5010-5.

- Reddy, S. G., Wong, K. K., Parast, C. V., Peisach, J., Magliozzo, R. S. and Kozarich, J. W. (1998). "Dioxygen inactivation of pyruvate formate-lyase: EPR evidence for the formation of protein-based sulfinyl and peroxy radicals." Biochemistry **37**(2): 558-63.
- Reichard, P. and Ehrenberg, A. (1983). "Ribonucleotide reductase--a radical enzyme." Science **221**(4610): 514-9.
- Reichard, P. (1993). "The anaerobic ribonucleotide reductase from Escherichia coli." J Biol Chem **268**(12): 8383-6.
- Riggs-Gelasco, P. J., Shu, L., Chen, S., Burdi, D., Huynh, B. H., Que, L. J. and Stubbe, J. (1998). "EXAFS Characterization of the Intermediate X Generated During the Assembly of the Escherichia coli Ribonucleotide Reductase R2 Diferric Tyrosyl Radical Cofactor." J. Am. Chem. Soc. **120**(5): 849-860.
- Rogers, M. S. and Dooley, D. M. (2001). "Posttranslationally modified tyrosines from galactose oxidase and cytochrome c oxidase." Adv Protein Chem **58**: 387-436.
- S -**
- Sahlin, M., Sjöberg, B. M., Backes, G., Loehr, T. and Sanders-Loehr, J. (1990). "Activation of the iron-containing B2 protein of ribonucleotide reductase by hydrogen peroxide." Biochem Biophys Res Commun **167**(2): 813-8.
- Sankaranarayanan, R., Dock-Bregeon, A. C., Rees, B., Bovee, M., Caillet, J., Romby, P., Francklyn, C. S. and Moras, D. (2000). "Zinc ion mediated amino acid discrimination by threonyl-tRNA synthetase." Nat Struct Biol **7**(6): 461-5.
- Selmer, T. and Andrei, P. I. (2001). "p-Hydroxyphenylacetate decarboxylase from Clostridium difficile. A novel glycyl radical enzyme catalysing the formation of p-cresol." Eur J Biochem **268**(5): 1363-72.
- Selmer, T., Pierik, A. J. and Heider, J. (2005). "New glycyl radical enzymes catalysing key metabolic steps in anaerobic bacteria." Biol Chem **386**(10): 981-8.

- Siedow, A., Cramm, R., Siddiqui, R. A. and Friedrich, B. (1999). "A megaplasmid-borne anaerobic ribonucleotide reductase in *Alcaligenes eutrophus* H16." J Bacteriol **181**(16): 4919-28.
- Sivaraja, M., Goodin, D. B., Smith, M. and Hoffman, B. M. (1989). "Identification by ENDOR of Trp191 as the free-radical site in cytochrome c peroxidase compound ES." Science **245**(4919): 738-40.
- Sjoberg, B. M. and Reichard, P. (1977). "Nature of the free radical in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*." J Biol Chem **252**(2): 536-41.
- Sjoberg, B. M., Karlsson, M. and Jornvall, H. (1987). "Half-site reactivity of the tyrosyl radical of ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*." J Biol Chem **262**(20): 9736-9743.
- Sofia, H. J., Chen, G., Hetzler, B. G., Reyes-Spindola, J. F. and Miller, N. E. (2001). "Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods." Nucleic Acids Res **29**(5): 1097-106.
- Solomon, E. I., Brunold, T. C., Davis, M. I., Kemsley, J. N., Lee, S. K., Lehnert, N., Neese, F., Skulan, A. J., Yang, Y. S. and Zhou, J. (2000). "Geometric and electronic structure/function correlations in non-heme iron enzymes." Chem Rev **100**(1): 235-350.
- Stubbe, J. (1990). "Ribonucleotide reductases: amazing and confusing." J Biol Chem **265**(10): 5329-32.
- Stubbe, J. and van Der Donk, W. A. (1998a). "Protein Radicals in Enzyme Catalysis." Chem Rev **98**(2): 705-762.
- Stubbe, J. and Riggs-Gelasco, P. (1998b). "Harnessing free radicals: formation and function of the tyrosyl radical in ribonucleotide reductase." Trends Biochem Sci **23**(11): 438-43.
- Stubbe, J., Nocera, D. G., Yee, C. S. and Chang, M. C. (2003). "Radical initiation in the class I ribonucleotide reductase: long-range proton-coupled electron transfer?" Chem Rev **103**(6): 2167-201.

- Sturgeon, B. E., Burdi, D., Chen S., Huynh B. H., Edmondson D. E., Stubbe J. and Hoffman B. M. (1996). "Reconsideration of X, the diiron intermediate formed during cofactor assembly in E. coli ribonucleotide reductase." J Am Chem Soc **118**(32): 7551-7557.
- Sun, X., Harder, J., Krook, M., Jornvall, H., Sjoberg, B. M. and Reichard, P. (1993). "A possible glycine radical in anaerobic ribonucleotide reductase from Escherichia coli: nucleotide sequence of the cloned nrdD gene." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(2): 577-81.
- Sun, X., Eliasson, R., Pontis, E., Andersson, J., Buist, G., Sjoberg, B. M. and Reichard, P. (1995). "Generation of the glycy radical of the anaerobic Escherichia coli ribonucleotide reductase requires a specific activating enzyme." J Biol Chem **270**(6): 2443-6.
- Sun, X., Ollagnier, S., Schmidt, P. P., Atta, M., Mulliez, E., Lepape, L., Eliasson, R., Graslund, A., Fontecave, M., Reichard, P. and Sjoberg, B. M. (1996). "The free radical of the anaerobic ribonucleotide reductase from Escherichia coli is at glycine 681." J Biol Chem **271**(12): 6827-31.

- T -

- Tamarit, J., Mulliez, E., Meier, C., Trautwein, A. and Fontecave, M. (1999). "The anaerobic ribonucleotide reductase from Escherichia coli. The small protein is an activating enzyme containing a [4Fe-4S](2+) center." J Biol Chem **274**(44): 31291-6.
- Tanaka, M., Funahashi, S. and Shirai, K. (1968). ". " Inorg Chem **7**: 573-578.
- Torrents, E., Eliasson, R., Wolpher, H., Graslund, A. and Reichard, P. (2001). "The anaerobic ribonucleotide reductase from Lactococcus lactis. Interactions between the two proteins NrdD and NrdG." J Biol Chem **276**(36): 33488-94.

- U -

- Unkrig, V., Neugebauer, F. A. and Knappe, J. (1989). "The free radical of pyruvate formate-lyase. Characterization by EPR spectroscopy and involvement in catalysis as studied with the substrate-analogue hypophosphite." Eur J Biochem **184**(3): 723-8.

Uppsten, M., Farnegardh, M., Domkin, V. and Uhlin, U. (2006). "The first holocomplex structure of ribonucleotide reductase gives new insight into its mechanism of action." J Mol Biol **359**(2): 365-377.

- V -

Vallee, B. L. and Auld, D. S. (1990a). "Active-site zinc ligands and activated H₂O of zinc enzymes." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(1): 220-4.

Vallee, B. L. and Auld, D. S. (1990b). "Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins." Biochemistry **29**(24): 5647-59.

Vallee, B. L. and Auld, D. S. (1993). "New perspective on zinc biochemistry: cocatalytic sites in multi-zinc enzymes." Biochemistry **32**(26): 6493-500.

van der Meer, R. A., Jongejan, J. A. and Duine, J. A. (1989). "Pyrroloquinoline quinone as cofactor in galactose oxidase." J Biol Chem **264**(14): 7792-4.

Vass, I. and Styring, S. (1991). "pH-dependent charge equilibria between tyrosine-D and the S states in photosystem II. Estimation of relative midpoint redox potentials." Biochemistry **30**(3): 830-9.

Verfurth, K., Pierik, A. J., Leutwein, C., Zorn, S. and Heider, J. (2004). "Substrate specificities and electron paramagnetic resonance properties of benzylsuccinate synthases in anaerobic toluene and m-xylene metabolism." Arch Microbiol **181**(2): 155-62.

- W -

Wagner, A. F., Frey, M., Neugebauer, F. A., Schafer, W. and Knappe, J. (1992). "The free radical in pyruvate formate-lyase is located on glycine-734." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(3): 996-1000.

Wagner, A. F., Demand, J., Schilling, G., Pils, T. and Knappe, J. (1999). "A dehydroalanyl residue can capture the 5'-deoxyadenosyl radical generated from S-adenosylmethionine by pyruvate formate-lyase-activating enzyme." Biochem Biophys Res Commun **254**(2): 306-10.

- Wallar, B. J. and Lipscomb, J. D. (1996). "Dioxygen Activation by Enzymes Containing Binuclear Non-Heme Iron Clusters." Chem Rev **96**(7): 2625-2658.
- Walsby, C. J., Hong, W., Broderick, W. E., Cheek, J., Ortillo, D., Broderick, J. B. and Hoffman, B. M. (2002a). "Electron-nuclear double resonance spectroscopic evidence that S-adenosylmethionine binds in contact with the catalytically active [4Fe-4S](+) cluster of pyruvate formate-lyase activating enzyme." J Am Chem Soc **124**(12): 3143-51.
- Walsby, C. J., Ortillo, D., Broderick, W. E., Broderick, J. B. and Hoffman, B. M. (2002b). "An anchoring role for FeS clusters: chelation of the amino acid moiety of S-adenosylmethionine to the unique iron site of the [4Fe-4S] cluster of pyruvate formate-lyase activating enzyme." J Am Chem Soc **124**(38): 11270-1.
- Whittaker, M. M. and Whittaker, J. W. (1988). "The active site of galactose oxidase." J Biol Chem **263**(13): 6074-80.
- Whittaker, M. M., DeVito, V. L., Asher, S. A. and Whittaker, J. W. (1989). "Resonance Raman evidence for tyrosine involvement in the radical site of galactose oxidase." J Biol Chem **264**(13): 7104-6.
- Whittaker, M. M. and Whittaker, J. W. (1990). "A tyrosine-derived free radical in apogalactose oxidase." J Biol Chem **265**(17): 9610-3.
- Whittaker, M. M. and Whittaker, J. W. (1993). "Ligand interactions with galactose oxidase: mechanistic insights." Biophys J **64**(3): 762-72.
- Whittaker, M. M., Ballou, D. P. and Whittaker, J. W. (1998). "Kinetic isotope effects as probes of the mechanism of galactose oxidase." Biochemistry **37**(23): 8426-36.
- Whittaker, J. W. (2005). "The radical chemistry of galactose oxidase." Arch Biochem Biophys **433**(1): 227-39.
- Wilson, D. K. and Quioco, F. A. (1993). "A pre-transition-state mimic of an enzyme: X-ray structure of adenosine deaminase with bound 1-deazaadenosine and zinc-activated water." Biochemistry **32**(7): 1689-94.
- Wu, W., Booker, S., Lieder, K. W., Bandarian, V., Reed, G. H. and Frey, P. A. (2000). "Lysine 2,3-aminomutase and trans-4,5-dehydrolysine: characterization of an allylic analogue

of a substrate-based radical in the catalytic mechanism." Biochemistry **39**(31): 9561-70.

- Y -

Yamada, R., Tamao, Y. and Blakley, R. L. (1971). "Degradation of 5'-deoxyadenosylcobalamin by ribonucleoside triphosphate reductase and binding of degradation products to the active center." Biochemistry **10**(21): 3959-68.

Young, P., Andersson, J., Sahlin, M. and Sjöberg, B. M. (1996). "Bacteriophage T4 anaerobic ribonucleotide reductase contains a stable glycyl radical at position 580." J Biol Chem **271**(34): 20770-5.

- Z -

Zamble, D. B., McClure, C. P., Penner-Hahn, J. E. and Walsh, C. T. (2000). "The McbB component of microcin B17 synthetase is a zinc metalloprotein." Biochemistry **39**(51): 16190-9.

Zhang, W., Wong, K. K., Magliozzo, R. S. and Kozarich, J. W. (2001). "Inactivation of pyruvate formate-lyase by dioxygen: defining the mechanistic interplay of glycine 734 and cysteine 419 by rapid freeze-quench EPR." Biochemistry **40**(13): 4123-30.

Titre

La ribonucléotide réductase anaérobie d'*Escherichia coli*, une protéine à zinc. Importance du site métallique pour la structure et l'activité de l'enzyme.

Résumé

Les ribonucléotides réductases (RNRs) sont des enzymes ubiquitaires essentielles pour la synthèse d'ADN. La croissance en anaérobiose d'*Escherichia coli* dépend d'une RNR de classe III. L'enzyme activée contient un radical sensible à l'oxygène situé sur le résidu G681 dont la formation implique l'intervention concertée d'une protéine activatrice fer-soufre, de S-adenosylméthionine, de dithiothréitol (DTT), et d'un système réducteur. La structure cristallographique de la RNR du bactériophage T4 a révélé la présence d'un site métallique Zn(Cys)₄ dans la partie C-terminale de la réductase. Dans ce travail nous avons défini de nouvelles conditions de purification conduisant à des enzymes très actives, montré que le zinc contrôle la structuration de la boucle Cter contenant le site radicalaire et que, contrairement à ce qui était admis depuis plus de 15 ans, le DTT n'intervient pas dans la formation du radical Gly[•] mais plutôt dans les transferts radicalaires entre Gly[•] et le substrat.

Mots-clés : catalyse enzymatique, radical, zinc, protéolyse

Title

The anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*, a zinc protein. Importance of the metal-binding site for the enzyme structure and activation.

Abstract

Ribonucleotide reductases (RNRs) are critical enzymes for the *de novo* synthesis of DNA in all organisms. For its anaerobic growth, *Escherichia coli* depends on a class III RNR, which harbors in its active form an oxygen-sensitive free radical located on the Gly⁶⁸¹ residue, the formation of which involves the concerted action of four components :an activating iron-sulfur protein, S-adenosylmethionine, dithiothreitol (DTT), and a reducing system. A Zn(Cys)₄ center has recently been found in the C-terminal region of the crystal structure of the RNR from bacteriophage T4. In this work we define new conditions allowing for the preparation of a high specific activity reductase. We show that the zinc site controls the structuration of the Cter loop carrying the radical site. Finally we demonstrate that DTT is not essential for radical formation but rather acts on radical transfer reactions between Gly[•] and the substrate.

Key words : enzymatic catalysis, radical, zinc, proteolysis